

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**E.A.P. DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**

**Aislamiento y selección de actinomicetos rizosféricos  
con potencial aplicación como bioinoculante en el  
cultivo de *Solanum tuberosum* sp. *andigena* (Papa)**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Bióloga Microbióloga  
Parasitóloga

**AUTOR**

Jessica Elizabeth Cisneros Moscol

**ASESOR**

Jorge León Quispe

Lima - Perú

2016

## **DEDICATORIA**

A mis padres y hermanos por su apoyo incondicional, así como a  
todos mis familiares por su comprensión.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por iluminar siempre mi camino

A mis queridos padres Victor y Vilma, por haber confiado siempre en mi. Por motivarme a seguir creciendo profesionalmente y brindarme siempre su apoyo.

A mis hermanos, por ser mis modelos a seguir y guiarme en todo momento.

A toda mi familia, por ser tan unida, en especial a mi tía Socorro, por brindarme su amor y apoyarme siempre.

A mi Asesor Mg. Jorge León Quispe, por todo su apoyo, conocimientos y paciencia.

A Alex, por compartir triunfos y superar derrotas, brindándome palabras de aliento y por confiar siempre en mis capacidades.

A todos mis amigos del Laboratorio de Ecología Microbiana Claudia, Junior, Ula, Nadia, Abi y a todos por los gratos momentos compartidos.

A todos mis amigos que conocí en la Universidad y fuera de esta, por su confianza.

A los miembros de mi Jurado, por apoyarme en esta etapa.

Al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por financiar mi proyecto de tesis.

## ÍNDICE GENERAL

### RESUMEN

### ABSTRACT

I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. MARCO TEÓRICO .....	4
2.1 Generalidades de la papa ( <i>Solanum tuberosum</i> ) .....	4
2.2 Producción nacional y mundial de la papa.....	6
2.3 Cultivo de la papa .....	9
2.3.1 Condiciones agroclimáticas .....	9
2.3.2 Fertilización en el cultivo de la papa .....	10
2.3.3 Problemática en el cultivo de la papa .....	11
2.3.4 Alternativas de fertilización en el cultivo de la papa.....	12
2.3.5 Uso de bacterias para estimular el crecimiento de la papa .....	12
2.4 El suelo y sus componentes microbianos .....	13
2.5 Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) .....	14
2.5.1 Mecanismos implicados en la capacidad PGPR.....	15
2.5.1.1 Fijación de nitrógeno .....	15
2.5.1.2 Solubilización de fosfatos .....	16
2.5.1.3 Producción de sideróforos .....	17
2.5.1.4 Producción de ácido indol acético .....	18
2.6 Actinomicetos .....	19
2.6.1 Características generales .....	19
2.6.2 Condiciones de crecimiento .....	20
2.6.3 Ecología y distribución .....	21
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	22
3.1 Hipótesis .....	22
3.2 Objetivos.....	22

Objetivo general.....	22
Objetivos específicos.....	22
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
4.1 Materiales .....	23
4.1.1 Material biológico.....	23
4.2 Métodos. ....	23
4.2.1 Toma de muestra del suelo rizosférico. ....	23
4.2.2 Aislamiento y purificación de los actinomicetos. ....	23
4.2.3 Evaluación <i>in vitro</i> de las actividades de los actinomicetos relacionadas al PGPR. ....	24
4.2.3.1 Capacidad para la solubilización de fosfatos.....	24
4.2.3.2 Capacidad para fijar nitrógeno.....	25
4.2.3.3 Producción de ácido indol acético (AIA). ....	25
4.2.3.4 Producción de sideróforos. ....	26
4.2.4. Caracterización fenotípica de las cepas aisladas .....	27
4.2.4.1 Crecimiento a diferentes temperaturas.....	27
4.2.4.2 Crecimiento a diferentes pH .....	27
4.2.5. Confirmación del género de las cepas PGPR por medio de caracterización bioquímica .....	27
4.2.5.1 Prueba de la Oxidasa .....	28
4.2.5.2 Prueba de la Catalasa .....	28
4.2.5.3 Reducción de Nitratos .....	28
4.2.5.4 Hidrólisis de Urea .....	29
4.2.5.5. Prueba de la Caseína .....	29
4.2.5.6. Hidrólisis de Gelatina.....	29
4.2.6. Identificación molecular de los actinomicetos PGPR.....	30
V. RESULTADOS .....	31
5.1 Aislamiento y purificación de los actinomicetos. ....	31

5.2 Evaluación <i>in vitro</i> de las actividades de los actinomicetos relacionadas al PGPR.....	31
5.2.1 Solubilización de fosfatos. ....	31
5.2.2 Fijación de nitrógeno .....	35
5.2.3 Producción de ácido indol acético (AIA) .....	35
5.2.4 Producción de sideróforos .....	38
5.3 Caracterización fenotípica de las cepas con potencial PGPR .....	42
5.3.1 Crecimiento a diferentes temperaturas.....	42
5.3.2 Crecimiento a diferentes pH .....	42
5.4 Confirmación del género de las cepas PGPR por medio de caracterización bioquímica. ....	43
5.5 Identificación molecular de los actinomicetos PGPR.....	44
VI. DISCUSIÓN.....	46
VII. CONCLUSIONES.....	53
VIII RECOMENDACIONES.....	54
IX. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	55
XI. ANEXOS.....	67

## **ABREVIATURAS**

kcal: Kilocalorías

m: Metros

kg: Kilogramos

cm: Centímetros

TM: Tonelada métrica

ufc/g: Unidades formadoras de colonias por gramo

µm: Micrómetro

µg: Microgramo

mg/kg: Miligramo por kilogramo

p/v: Peso por volumen

µg/mL: Microgramo por mililitro

v/v: Volumen a volumen

rpm: Revoluciones por minuto

min: Minutos

nm: Nanómetros

µL: Microlitros

RNAr: Ácido ribonucleico ribosómico

DNA: Ácido desoxirribonucleico

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

pb: Pares de bases

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Producción de papa en el mundo, 2014. ....	8
<b>Tabla 2.</b> Características culturales de las cepas rizosféricas de actinomicetos aisladas de <i>Solanum tuberosum</i> del distrito de San Jerónimo - Andahuaylas – Perú, 2014. ....	32
<b>Tabla 3.</b> Capacidad de solubilización de fosfatos de 49 actinomicetos rizosféricos aislados de cultivos de <i>Solanum tuberosum</i> .....	33
<b>Tabla 4.</b> Área de solubilización de los 33 actinomicetos que presentaron la capacidad de solubilizar fosfatos. ....	34
<b>Tabla 5.</b> Capacidad fijadora de nitrógeno de las 49 cepas de actinomicetos aislados de la rizósfera de cultivos de <i>Solanum tuberosum</i> .....	36
<b>Tabla 6.</b> Evaluación colorimétrica de la capacidad de producción de AIA de las 49 cepas de actinomicetos rizosféricos aislados de cultivos de <i>Solanum tuberosum</i> al cabo de 15 días de incubación.....	37
<b>Tabla 7.</b> Evaluación cuantitativa de la capacidad de producción de AIA de los actinomicetos positivos para la evaluación anterior. ....	38
<b>Tabla 8.</b> Evaluación colorimétrica de la capacidad de producción de sideróforos de las 49 cepas de actinomicetos rizosféricos aislados de cultivos de <i>Solanum tuberosum</i> al cabo de 15 días de incubación.....	39
<b>Tabla 9:</b> Evaluación cuantitativa de la capacidad de producción de sideróforos de los actinomicetos positivos para la evaluación anterior.....	40



<b>Tabla 10:</b> Resumen de resultados de las actividades PGPR de las 49 cepas de actinomicetos rizosféricos aisladas de cultivos de <i>Solanum tuberosum</i> del distrito de San Jerónimo – Andahuaylas – Perú, 2014. ....	41
<b>Tabla 11:</b> Capacidad PGPR de las dos cepas seleccionadas de actinomicetos aislados de la rizósfera de <i>Solanum tuberosum</i> .....	42
<b>Tabla 12:</b> Caracterización fenotípica de las cepas AND13 y AND 16. ....	43
<b>Tabla 13:</b> Caracterización bioquímica de la cepa AND 13, actinomiceto con mejor capacidad como PGPR.....	44
<b>Tabla 14.</b> Curva patrón de la concentración del AIA comercial (SIGMA-ALDRICH).....	67
<b>Tabla 15.</b> Curva patrón de la concentración del sideróforos comercial “DESFERAL” (SIGMA-ALDRICH).....	67

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Árbol filogenético del actinomiceto rizosférico AND 13, presentando su ubicación filogenética en función del análisis de su RNAr 16S. Nivel de similitud > al 99% a <i>Streptomyces sampsonii</i> .....	45
<b>Figura 2.</b> Muestra de rizósfera y raíces obtenidos de cultivos de <i>Solanum tuberosum</i> .....	68
<b>Figura 3:</b> Aislamiento de actinomicetos en Agar Almidón Caseína.....	68
<b>Figura 4:</b> Prueba de solubilización de fosfatos en Agar Picovskaya. (Presencia de halos alrededor de las colonias).....	69
<b>Figura 5:</b> Prueba de solubilización de fosfatos en Agar SRSM.....	69
<b>Figura 6:</b> Prueba de fijación de nitrógeno, capacidad de crecimiento de las cepas de actinomicetos en Agar NFB.....	70
<b>Figura 7:</b> Prueba cualitativa de producción de AIA de las cepas de actinomicetos aislados de la rizósfera de <i>S. tuberosum</i> . ....	70
<b>Figura 8:</b> Prueba cualitativa de producción de sideróforos de las cepas de actinomicetos aislados de la rizósfera de <i>S. tuberosum</i> .....	71
<b>Figura 9:</b> Caracterización fenotípica de las cepas AND 13 y AND 16 a diferente pH .....	71
<b>Figura 10:</b> Caracterización fenotípica de las cepas AND 13 y AND 16 a diferente temperatura.....	72
<b>Figura 11:</b> Actinomicetos seleccionados con potencial PGPR.....	72

<b>Figura 12.</b> Solubilización de fosfatos de las cepas de actinomicetos rizosféricos aislados de cultivos de <i>Solanum tuberosum</i> durante 15 días .....	73
<b>Figura 13:</b> Curva patrón de la concentración del AIA comercial (SIGMA-ALDRICH) .....	74
<b>Figura 14:</b> Curva patrón de la concentración del sideróforo comercial “DESFERAL” (SIGMA-ALDRICH) .....	75

## RESUMEN

El cultivo de *Solanum tuberosum* L. es originario de los Andes y fue la base de la dieta alimenticia de las culturas prehispánicas; en la actualidad ocupa el cuarto lugar como principal producto alimenticio a nivel mundial, siendo Perú el país que posee la mayor cantidad de especies de papa. Sin embargo, la producción y rentabilidad del cultivo de *Solanum tuberosum* (papa) se ha visto reducida por algunas limitaciones como la baja calidad del suelo, el uso indiscriminado de agroquímicos, así como la presencia de fitopatógenos; es por eso, que se buscan nuevas alternativas biotecnológicas utilizando microorganismos benéficos propios de la planta. El presente trabajo tiene como objetivo evaluar la capacidad promotora de crecimiento vegetal (PGPR) de actinomicetos aislados de la rizósfera de plantaciones de papa colectadas en el distrito de San Jerónimo - Andahuaylas. Para ello, se evaluaron 4 características relacionadas a las bacterias consideradas como PGPR (Solubilización de fosfatos, fijación de nitrógeno, producción de AIA y sideróforos). De las 49 cepas de actinomicetos rizosféricos aisladas y evaluadas, la cepa AND 13 presentó mejor rendimiento en las pruebas como PGPR, así como, gran capacidad de adaptación y crecimiento a diferentes temperaturas y pH; siendo identificada mediante pruebas bioquímicas y moleculares como *Streptomyces sampsonii*.

En conclusión, estos resultados indican que la cepa AND 13 podría ser utilizada a futuro como una solución alterna ante el uso excesivo de agroquímicos.

**Palabras Claves:** Rizósfera, Actinomicetos, PGPR, Biofertilizantes, Perú.

## ABSTRACT

The *Solanum tuberosum* L. crop was native of the Andes and it was the basis of the diet of pre-Hispanic cultures; that it currently ranks fourth as main foodstuff worldwide, Peru is the country that has the largest number of potato species. However, the production and profitability of the cultivation of *Solanum tuberosum* (potato) has been reduced by some limitations, such as low soil quality, the indiscriminate use of agrochemicals and the presence of pathogens; for this reason new biotechnology alternatives are sought using own plant beneficial microorganisms. The present study aims to assess the promoting plant growth ability (PGPR) of actinomycetes strains isolated from the rhizosphere of potato crops collected in the District of San Jerónimo - Andahuaylas. Four features related to bacteria considered as PGPR (phosphates solubilization, nitrogen fixation, production of siderophores and AIA) were evaluated. Of the 49 strains of rhizosphere actinomycetes isolated and evaluated, the AND 13 strain presented the best performance on tests as PGPR, as well as great ability of adaptation and growth to different temperatures and pH; it was identified using biochemical and molecular tests as *Streptomyces sampsonii*.

In conclusion, these results indicate that the AND 13 strain could be used in the future as an alternative solution to the excessive use of agrochemicals.

**Key words:** Actinomycetes, PGPR, biofertilizers, rhizosphere, Peru.

## I. INTRODUCCIÓN

La planta de la papa ha sido cultivada desde las culturas Pre - Incas e Incas, se considera que Perú es el país de origen de este tubérculo y que el territorio peruano posee la mayor cantidad de especies de papa conocidas en el mundo (MINAGRI, 2012).

La papa, es el cuarto principal producto alimenticio, después del trigo, el arroz y el maíz. Una papa de tamaño mediano contiene alrededor de la mitad de los requerimientos diarios de vitamina C de una persona adulta. Otros cultivos de primera necesidad como el arroz o el trigo no poseen este elemento. La papa es muy baja en grasa, con sólo el 5% del contenido de grasa del trigo y una cuarta parte de las calorías del pan (MINAGRI, 2013).

El cultivo de *Solanum tuberosum* L. "papa", se encuentra expuesto a una serie de limitaciones que ocasionan una disminución en la productividad y rentabilidad del cultivo. Siendo el uso indiscriminado de agroquímicos uno de los principales problemas de este cultivo, esta situación ha desencadenado un rápido incremento en la contaminación del agua, suelo y aire, debido a la alta toxicidad que presentan la mayor parte de estos agroquímicos (Bolaños *et al.*, 2002).

Si bien es cierto los fertilizantes químicos brindan un efecto positivo en la producción, sin embargo, al mismo tiempo, se produce la degradación de los suelos ocasionando pérdidas en sus propiedades físicas, químicas y biológicas; dañando de esta manera las funciones intrínsecas del suelo y permitiendo la

aparición de enfermedades e insectos resistentes que para su control requieren de otros insumos más tóxicos, convirtiéndose en un círculo vicioso, que afecta negativamente la calidad, cantidad y rentabilidad del producto (Bolaños *et al.*, 2002).

Por ello es muy importante buscar nuevas alternativas que permitan aumentar la producción, beneficiando al cultivo de *Solanum tuberosum* L. en favor de la economía de nuestro país. Desde el punto de vista ecológico, es necesario conocer la comunidad bacteriana donde se localiza el cultivo, con el fin de potenciar su acción y favorecer su posterior aplicación como inoculantes (Terry *et al.*, 2005).

La microbiota de la rizósfera puede acelerar el crecimiento de las plantas a través de reguladores de crecimiento vegetal, al aumentar la velocidad de germinación de semillas, estimular la formación de raíces, fortalecer los mecanismos naturales de defensa de la planta a enfermedades e insectos patógenos, incrementar la respuesta a la fertilización química u orgánica y aumentar la tolerancia al estrés hídrico; todo esto promueve mejores efectos sobre la calidad del suelo y la cosecha, efectos que se buscan sean permanentes durante el ciclo de desarrollo del cultivo (Higa *et al.*, 1994; Terry *et al.*, 2005; Galindo *et al.*, 2006).

De acuerdo a esta problemática, se considera la posibilidad de encontrar un grupo de actinomicetos dentro de los aislados de la rizósfera de *Solanum tuberosum* sp. *andigena* provenientes de la provincia de Andahuaylas en el

departamento de Apurímac, cuyos miembros o sus metabolitos secundarios puedan ser utilizados como rizobacterias Promotores de Crecimiento Vegetal (PGPR, Plant Growth Promoting Rhizobacterias), siendo de esta manera de gran utilidad en la cadena productiva de este tubérculo.



## II. MARCO TEORICO

### 2.1 Generalidades de la papa (*Solanum tuberosum*)

El cultivo de *Solanum tuberosum* L. es originario de los Andes. Los procesos de domesticación y procesamiento artesanal de este cultivo fueron realizados por las culturas prehispánicas, convirtiéndose este tubérculo en la base de su dieta alimenticia (MINAGRI, 2012).

Las especies cultivadas de la papa están clasificadas dentro de la siguiente posición taxonómica según el Sistema de Engler (Engler, 1887–1915).

Citado por Solano (2000).

Reino: Vegetal

División: Phanerogamae

Subdivisión: Angiospermae

Clase: Dicotyledoneae

Subclase: Methachlamydeae

Orden: Solanales

Familia: Solanaceae

Género: *Solanum*

Especie: *Solanum tuberosum* L.

Sub. Especies: *S. tuberosum* subespecie. *tuberosum*

*S. tuberosum* subespecie. *andigena*.

Existen tres grupos de papas: las silvestres, que no son aptas para consumo humano, pero que son fuentes de mejoramiento. Las nativas, que se cultivan

en zonas altas donde no hay mucha incidencia de plagas y enfermedades, por lo tanto su manejo es más natural, esta variedad representa el 30% de la producción nacional. El tercer grupo son las papas híbridas que resultan de los procesos de mejoramiento y representan el 70% de la producción nacional (Carrasco, 2015).

La papa se produce en la actualidad en 143 países, y alimenta diariamente a cientos de millones de personas. De acuerdo a la Organización para la Alimentación y la Agricultura de la Naciones Unidas (FAO), la papa ocupa el cuarto lugar de los principales cultivos alimenticios del mundo, después del trigo, el maíz y el arroz (CIP, 2012).

En cuanto al contenido de sustancias nutritivas, la papa produce alrededor de 80 kcal/100 gr de peso fresco y tiene cerca del 2% de proteínas con un alto contenido de lisina, haciéndola un aditivo valioso en dietas basadas en cereales, las cuales generalmente, son deficientes en este aminoácido (Horton, 1992).

La papa tiene poca grasa. Poseen abundantes micronutrientes, sobre todo vitamina C: una papa media, de 150 gramos, consumida con su piel, aporta casi la mitad de las necesidades diarias del adulto (100 mg) (MINAGRI, 2012). La papa contiene una cantidad moderada de hierro, pero su gran contenido de vitamina C fomenta la absorción de este mineral. Además, este tubérculo tiene vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>3</sub> y B<sub>6</sub>, y otros minerales como potasio, fósforo y magnesio, así como folato, ácido pantoténico y riboflavina. También contiene antioxidantes

alimentarios, los cuales pueden contribuir a prevenir enfermedades relacionadas con el envejecimiento, y fibra, cuyo consumo es adecuado para la salud (FAO, 2008).

## **2.2 Producción nacional y mundial de la papa**

La papa se cultiva en 19 de los 24 departamentos del Perú, existiendo condiciones climáticas favorables para la producción de variedades de interés comercial (consumo fresco y procesamiento) durante todo el año. Más del 90% de los cultivos se instalan en la sierra, concentrándose las unidades agropecuarias dedicadas a este cultivo en las regiones Quechua y Suni, que van desde los 2 300 m hasta los 4 100 m de altitud. Las principales zonas de producción en la sierra son: Huánuco, Junín, Puno (que posee la mayor extensión dedicada al cultivo), La Libertad (principal abastecedor del norte del país), Apurímac, Cusco y Cajamarca (MINAGRI, 2013).

El Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI), dio a conocer que la producción de papa entre los años 2004-2013, se incrementó de 3 millones 8 miles de toneladas en el año 2004 hasta alcanzar las 4 millones 571 mil de toneladas métricas en el 2013, lo que significó un crecimiento de 45% y una tasa promedio anual de 3,8% (INEI, 2014) el mismo que se viene sustentando por la mayor área cosechada dado que los rendimientos promedios aun continúan bajos en ciertas zonas productoras del país (MINAGRI, 2012).

En la costa, destacan la producción de los departamentos de Lima e Ica. Los rendimientos promedio más altos en la costa se explican por factores climáticos

(ausencia de heladas y sequías), la calidad de la semilla (con certificación), el potencial de rendimiento de las variedades sembradas, el nivel de fertilización, la mecanización en la producción, el riego y el control de plagas y enfermedades (tecnologías apropiadas) (CAPAC, 2008).

Perú se ha convertido en el primer productor de papa de América Latina, produce ahora casi 4'700,000 millones de toneladas de papa al año, inclusive superando a Brasil (Ordinola, 2014) En el “ranking” mundial, según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), en el año 2012, el Perú se posicionó en el décimo séptimo lugar (FAOSTAT, 2014) (Tabla 1).

Los productores de papa en el Perú destinan del total de la producción, un 48,1% (176 mil 780 hectáreas) para la venta y un 46,9% (172 mil 510 hectáreas) para autoconsumo (INEI, 2014). Teniendo un crecimiento del consumo “per cápita” de 65 kg. a 85 kg. en los últimos 12 años. Esto es importante porque este crecimiento indica que cada año hay mayor fuente de ingreso para los pequeños productores de papa (Ordinola, 2014).

El valor FOB de las exportaciones de papa en los últimos 10 años creció en 1 791%, con una tasa de crecimiento promedio anual de 34%. En el año 2013, alcanzó un valor record de 1 651 millones de US\$, mayor en 78% al del año 2012 (INEI, 2014).

**TABLA 1.** Producción de papa en el mundo, 2014

<b>Posición</b>	<b>País</b>	<b>Producción de papa (toneladas)</b>
1	China	85 920 000
2	India	45 000 000
3	Rusia	29 532 530
4	Ucrania	23 250 200
5	Estados Unidos	19 165 865
6	Alemania	10 665 600
7	Polonia	9 091 900
8	Bangladesh	8 205 470
9	Bielorrusia	6 910 945
10	Países Bajos	6 765 618
11	Francia	6 340 807
12	Irán	5 400 000
13	Turquía	4 822 000
14	Canadá	4 590 296
15	Reino Unido	4 553 000
16	Egipto	4 500 000
17	Perú	4 473 503
18	Algeria	4 219 476
19	Pakistán	4 104 400
20	Brasil	3 731 798

Fuente: FAOSTAT, 2014

Las exportaciones de papa en todas sus variedades (papas preparadas o conservadas sin congelar, papas cocidas en agua o vapor, congeladas, las demás papas frescas o refrigeradas) llegaron aproximadamente a 40 mercados externos, siendo liderada por Bolivia donde se destina el 38% de las ventas al exterior, seguido de Estados Unidos de América (24%), Francia (13%) y Chile (4%), que en conjunto concentraron el 79% de total exportado (INEI, 2014).

## **2.3 Cultivo de la papa**

El crecimiento fenológico del cultivo de papa se inicia con el brotamiento del tubérculo y finaliza con la madurez fisiológica del mismo, al iniciarse la cosecha. Durante su crecimiento y desarrollo, sufre una serie de eventos o fases a nivel de órganos vegetativos y reproductivos referidos a la aparición, transformación y caída de estos. El ciclo vegetativo del cultivo puede tener una duración de 3 a 7 meses dependiendo de la variedad. Según la duración del ciclo vegetativo del cultivo las variedades de papa pueden ser precoces, semitardías y tardías. La duración del ciclo vegetativo de una variedad depende de las condiciones climáticas desfavorables, manejo agronómico inadecuado en las labores de riego y fertilización, entre otras (MINAGRI, 2006).

### **2.3.1 Condiciones agroclimáticas**

Según el MINAGRI, la papa se cultiva en más de 150 países, en clima templado, subtropical y tropical. Es esencialmente un “cultivo de clima templado”, para cuya producción la temperatura representa el límite principal: las temperaturas inferiores a 10° C y superiores a 30° C que inhiben decididamente el desarrollo del tubérculo, mientras que la mejor producción ocurre donde la temperatura diaria se mantiene en promedio de 18° a 20° C.

Asimismo, la respuesta a la longitud del día o fotoperiodo depende de la subespecie y variedad considerada. La subespecie *andigena*, tuberiza adecuadamente bajo condiciones de día corto y al ser llevada a condiciones de fotoperiodo largo, el periodo de crecimiento se alarga excesivamente, florece

profusamente, pero no tuberiza o lo hace escasamente, es decir, produce tubérculos pequeños (MINAGRI, 2011).

Las papas pueden crecer casi en todos los tipos de suelos, salvo donde son muy salinos o alcalinos. Los suelos naturalmente que ofrecen menos resistencia al crecimiento de los tubérculos son los más convenientes, y los suelos arcillosos o de arena con arcilla y abundante materia orgánica con buen drenaje y ventilación, son los mejores. Se considera ideal un pH de 5,2 a 7,5 en el suelo y con una profundidad entre 25 y 30 cm (MINAGRI, 2012).

A su vez este cultivo requiere de humedad abundante y regular pues es particularmente sensible a la sequía. Los rendimientos son mayores cuando la humedad del suelo se mantiene uniformemente por encima del 60 o 70 % de la capacidad de campo. Sin embargo, aunque es muy exigente en agua, un exceso detiene el desarrollo de los tubérculos y favorece el desarrollo de enfermedades (Arce, 2002).

### **2.3.2 Fertilización en el cultivo de la papa**

La correcta fertilización (el tipo de abono, la dosis, el fraccionamiento y el momento de aplicación) dependerá de los requerimientos de la planta (variedad, edad de la planta), contenido nutricional y características del suelo (textura, pH), sistema de riego, disponibilidad de agua, entre otros factores.

Para cumplir con una adecuada fertilización, es importante realizar un estudio previo de los nutrientes y características del suelo. Como norma general y en

suelos normales la relación N: P: K (Nitrógeno, Fósforo y Potasio) recomendada es 1:2:2, aunque cada caso puede ser diferente (Arce, 2002).

Por otro lado, el cultivo de papa responde muy bien a los aportes orgánicos. La dosis óptima se encuentra entre 25 a 30 TM de estiércol por hectárea, si se sobrepasa esta cifra se obtendría un desarrollo de vegetación exagerado y una reducción de la tuberización (Alonso & Méndez, 2001).

### **2.3.3 Problemática en el cultivo de la papa**

Son varios los factores que tienen injerencia en la problemática del cultivo de la papa, siendo el principal problema que los productores, en su mayoría, no realizan un análisis de suelo previo a la siembra, o lo hacen de forma empírica por recomendaciones de proveedores comerciales, recomendaciones de sus vecinos, por experiencia en años anteriores o por la disponibilidad de sus recursos económicos.

Entre los productores hay un conocimiento escaso de la importancia de los elementos mayores, secundarios y micro elementos en el crecimiento y desarrollo de la papa. Además, tienen poca información de las características biológicas, químicas y físicas del suelo referido al aumento de la producción de tubérculos en cantidad y calidad.

En algunos casos, los productores solo usan abono orgánico, otros combinan o complementan la fertilización química con el abonamiento orgánico. En otros casos aparte de usar fertilización química aplican abonos foliares solubles y



reguladores de crecimiento. Igualmente, en el mercado se encuentran formulaciones de fertilizantes compuestos que contienen a la vez nitrógeno, fósforo, potasio, azufre, calcio, magnesio y en otros casos hay formulaciones de fertilizantes específicas para papa (MINAGRI, 2012).

#### **2.3.4 Alternativas de fertilización en el cultivo de la papa**

Con base en la problemática descrita anteriormente acerca de los costos de producción asociados al análisis del suelo para la correcta utilización de los fertilizantes (ya sean químicos u orgánicos), es importante desarrollar alternativas que permitan disminuir el efecto nocivo residual que dejan los agroquímicos, mejorar el equilibrio biológico y la fertilidad del suelo.

La restauración de los agro-ecosistemas perturbados por el uso de agroquímicos incluye hoy día el uso de microorganismos localmente adaptados (Ramírez *et al.*, 2008) que abran la posibilidad de generar bioinsumos, que al aumentar la calidad y precio del producto mejoren la rentabilidad bruta del cultivo (Mejía *et al.*, 2009); dentro de esas alternativas encontramos los abonos orgánicos y los biofertilizantes incluidos los microorganismos eficientes.

#### **2.3.5 Uso de bacterias para estimular el crecimiento de la papa**

Las comunidades microbianas del suelo son de vital importancia para el mantenimiento del balance ecológico del mismo y por lo tanto de la sostenibilidad de ambientes naturales o agroecosistemas. Se encuentran, en su mayor parte, en la rizósfera y en las raíces de las plantas (MINAGRI, 2011).

Los microorganismos promotores de crecimiento de vegetal pueden ser considerados microorganismos benéficos ya que influyen la salud de la planta, estos efectos benéficos ya han sido reportados con anterioridad para diferentes cultivos como herbáceas, papa, frijol, soya, cítricos, banano, entre otros, todo eso debido a diversos mecanismos como la producción de fitohormonas, solubilidad de fosfatos, fijación de nitrógeno o control biológico sobre patógenos, las bacterias frecuentemente reportadas son cepas de *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Enterobacter* y *Serratia* (Jaizme *et al.*, 2003; Rivera. *et al.*, 2008).

## **2.4 El suelo y sus componentes microbianos**

El suelo corresponde a la parte más externa de la corteza terrestre. Puede ser considerado como un sistema de interacción entre una fase sólida (material mineral y orgánica), una fase líquida y una fase gaseosa. El hábitat que presenta es bastante complejo, no sólo por la riqueza de componentes que presenta, sino por la gran diversidad de organismos presentes en él (MINAGRI, 2012).

Los microorganismos resultan de gran importancia pues se relacionan con los procesos de edafogénesis y los ciclos biogeoquímicos. La concentración de microorganismos en el suelo puede ser hasta  $10^9$  ufc/g y poseer un estimado de  $10^4$  especies microbianas diferentes por gramo de suelo (Cavaletti *et al.* 2006), siendo los actinomicetos y hongos los grupos de microorganismos más numerosos en el suelo, entre  $10^6$  -  $10^7$  y  $10^4$  -  $10^6$  ufc/g respectivamente (Sylvia *et al.*, 1998).

## 2.5 Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR)

Las bacterias promotoras de crecimiento vegetal son capaces de colonizar la raíz, por tal motivo, se les conoce como rizobacterias, y estimular el crecimiento de las plantas.

Son diversos los mecanismos que comprenden las PGPR, tales como: fijación asimbiótica de N<sub>2</sub> (Boddey & Döbereiner, 1995), producción de sideróforos (Scher & Baker, 1982), solubilización de fosfato mineral (Kloepper *et al.*, 1989), la habilidad de producir o cambiar la concentración de fitohormonas como el Ácido Indol Acético (Mordukhova *et al.*, 1991), ácido giberélico (Mahmoud *et al.*, 1984), citoquinas (Tien *et al.*, 1979), y etileno (Glick, 1995).

Las PGPR están asociadas a muchos tipos de plantas y se encuentran comúnmente en diversos ambientes. Algunas rizobacterias colonizan la superficie de la raíz y la interfase del suelo subsiguiente; algunas otras pueden tener características endofíticas en raíz, vástago, hojas, tubérculo y otros órganos (Compant *et al.*, 2005).

Las PGPR deben cumplir tres características intrínsecas: Ser capaces de colonizar la raíz o su zona de influencia; sobrevivir y multiplicarse en los micro-hábitat asociados a la superficie de la raíz donde compiten con la microbiota natural, al menos el tiempo suficiente para ejercer de forma efectiva su actividad promotora de crecimiento; y estimular el crecimiento vegetal (Kloepper *et al.*, 1989).

## **2.5.1 Mecanismos implicados en la capacidad PGPR**

### **2.5.1.1 Fijación de nitrógeno**

La fijación de nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) es un proceso indispensable para el desarrollo de la planta, es considerado como uno de los fertilizantes más importantes en una plantación, ya que, es primordial en la formación de estructuras moleculares como los ácidos nucleicos, aminoazúcares, aminoácidos, entre otros (Franco, 2008).

El nitrógeno molecular, debido a su triple enlace, es una molécula que solo es aprovechada por un pequeño grupo de microorganismos altamente especializados. Estos microorganismos, reportados en elevado número en las zonas adyacentes a la raíz, utilizan el  $N_2$  como compuesto esencial para su crecimiento y desarrollo, otorgando adicionalmente a la planta el nitrógeno necesario y esta, a su vez, le proporciona una fuente de carbono disponible en los exudados de la raíz (Franco, 2008; Agüero, 2009).

La fijación biológica de nitrógeno se lleva a cabo exclusivamente por procariontes que tienen la capacidad de reducir el nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) a amonio ( $NH_4$ ), que puede ser utilizado por las plantas, contribuyendo a la mejora y productividad de los cultivos (Zehr *et al.*, 2003, Philippot & Germon, 2005).

Por tanto, cualquier deficiencia en los compuestos nitrogenados orgánicos e inorgánicos del suelo estimula la fijación microbiana de  $N_2$  (Roâzcycki *et al.*, 1999).

### **2.5.1.2 Solubilización de fosfatos**

El fósforo está estrechamente relacionado a los procesos de acumulación y liberación de energía durante el metabolismo celular, es considerado el segundo fertilizante esencial después del nitrógeno, necesario para el desarrollo de microorganismos y plantas (Taurian *et al.*, 2010).

En el suelo, el fósforo se presenta en forma orgánica e inorgánica; sin embargo, las plantas solo pueden absorber su forma inorgánica. Comportándose como un factor limitante del desarrollo vegetal pues las concentraciones de fósforo asimilables son muy bajas, normalmente varían entre 5 y 30 mg/kg. Esto se debe a que el fósforo soluble reacciona con iones como el calcio (en suelos alcalinos), el hierro o el aluminio (en suelos ácidos), que provocan su precipitación, adsorción y retención, disminuyendo su disponibilidad para las plantas (Atlas, 2002).

Los fosfatos inorgánicos aplicados como fertilizantes químicos también son inmovilizados en el suelo y como consecuencia no pueden ser aprovechados totalmente por los cultivos. Los microorganismos solubilizadores de fosfato realizan transformaciones de compuestos orgánicos e inorgánicos del fósforo por mecanismos como: la mineralización de compuestos orgánicos, donde se convierte fósforo orgánico en fosfato mono y di-ácido (ión ortofosfato) por medio de enzimas fosfatasas ácidas de las plantas o las fosfatasas ácidas o básicas de microorganismos; la solubilización a través de la producción de ácidos orgánicos, la presencia de éstos implica un descenso en el pH hasta valores aproximados a 2, valores necesarios para que pueda llevarse a cabo la

solubilización; y la óxido-reducción, es llevada a cabo por microorganismos que utilizan la forma fosfito de fósforo y lo transforman en fosfato dentro de la célula (Bobadilla *et al.*, 2008).

En el 2008 se reportó la capacidad de solubilizar fosfato por parte de los actinomicetos relacionado a la producción de ácidos orgánicos, donde el ácido glucónico es el compuesto solubilizador más frecuente (Sousa *et al.*, 2008).

### **2.5.1.3 Producción de sideróforos**

Los sideróforos son compuestos producidos por diferentes microorganismos del suelo que basan su actividad en fenómenos de quelación, un fenómeno rutinario en los sistemas biológicos (Neilands, 1995).

Los microorganismos están en íntimo contacto con el medio ambiente y por lo tanto se ven afectados por los cambios que ocurran en este.

En condiciones normales, el hierro es escaso debido a su rápida oxidación y la consiguiente formación de hidróxidos insolubles. Por lo que las bacterias han tenido que desarrollar mecanismos eficientes de captación de hierro con el fin de garantizar un suministro suficiente. Estas pueden sintetizar, excretar y finalmente reabsorber compuestos de bajo peso molecular quelantes de hierro denominados sideróforos (Crowel *et al.*, 1991), los cuales son capaces de superar las barreras termodinámicas y cinéticas involucrando en el secuestro y la movilización del hierro.

La “nutrición del hierro” es considerado uno de los principales factores para un mejor crecimiento vegetal. La evidencia también sugiere que las plantas tienen la habilidad de aceptar el hierro derivado de los complejos sideróforos bacteriano-hierro (Chincholkar *et al.*, 2007).

#### **2.5.1.4 Producción de ácido indol acético**

Las fitohormonas tienen un rol muy importante como reguladoras del crecimiento y desarrollo de las plantas (Tsavkelova *et al.*, 2006).

De acuerdo a la clasificación convencional, existen cinco grupos de fitohormonas: auxinas, giberelinas, citoquinas, etileno y ácido absícico.

Las auxinas estimulan la producción de etileno en diversos tejidos; aumentan el tamaño de los frutos al estimular el crecimiento de las células, actuando sobre la elongación y división celular, importante en el crecimiento de órganos y frutos. A su vez, incrementan la resistencia de las plantas a factores ambientales y pueden inducir o suprimir la expresión de genes y la síntesis de enzimas, pigmentos y metabolitos (Tsavkelova *et al.*, 2006).

El ácido indol acético (AIA), tiene una estructura química similar a la del aminoácido triptófano, es quizá una de las auxinas más conocidas, capaz de producir raíces adventicias, alargar raíces primarias, así como controlar tropismos como giros o curvaturas en los tallos; sin embargo, es poco lo que se conoce acerca de su metabolismo, transporte y distribución final (Castellanos *et al.*, 2009).

Debido a su similitud con el triptófano, hoy en día se conocen 4 vías de formación de esta auxina a partir de un intermediario distinto en cada caso. En las bacterias, el AIA se produce a partir del triptófano (precursor) a través de la vía Indolil-Acetamida (IAM), aunque existe una vía alternativa utilizando el ácido 3-indolil pirúvico (IPvA) (Celis & Gallardo, 2007).

## **2.6 Actinomicetos**

### **2.6.1 Características generales**

Los actinomicetos constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos, son bacterias Gram positivas, ácido resistente, que se caracterizan por su morfología filamentosa debido a la capacidad de formación de agregados filiformes (Sylvia, 2005).

Actualmente, los actinomicetos se encuentran incluidos en el dominio bacteria debido a las siguientes razones: su pared celular está compuesta por peptidoglicano, el diámetro de sus hifas es inferior al de los hongos (0,5 a 2,0  $\mu\text{m}$ ), son sensibles a los antibacterianos, pero presentan resistencia a los antifúngicos y la disposición de su material genético es típicamente procariótico (Sylvia, 2005).

Estas bacterias son aerobias y algunas anaerobias facultativas, pudiéndose encontrar en el suelo, animales y el hombre. Frecuentemente alcanzan grandes densidades poblacionales en suelos con alto contenido de materia orgánica, amplias reservas de carbono asimilable y humus (Fernández, 1988).



Presentan un olor característico a “tierra húmeda”, el cual se debe a compuestos volátiles sintetizados por ellos mismos como el metabolito secundario geosmina; adicionalmente presentan una actividad metabólica alta debido a que producen terpenoides, pigmentos y enzimas extracelulares con las que degradan la materia orgánica de origen vegetal y animal; a su vez son capaces de producir metabolitos secundarios, dentro de los que se incluyen diferentes tipos de compuestos de gran importancia económica como los antibióticos, pigmentos, toxinas, hormonas, inhibidores enzimáticos, agentes inmunomoduladores, antagonistas y agonistas de receptores, agentes antitumorales, y promotores del crecimiento (Evangelista, 2007; Franco, 2009).

### **2.6.2 Condiciones de crecimiento**

La adición de materia orgánica a los suelos estimula la multiplicación y la actividad de los actinomicetos. Los suelos alcalinos y neutros resultan más favorables para el desarrollo de estas bacterias; el rango de pH óptimo para las actividades de estos microorganismos se encuentra entre 6,5 y 8,0; en suelos con pH por debajo de 5,0 es frecuente observar su ausencia (Titus & Pereira, 2007).

Los actinomicetos al ser principalmente aerobios se desarrollan favorablemente en suelos bien aireados, suelos con humedades entre 80 y 90% son perjudiciales para su desarrollo (Titus & Pereira, 2007).

El crecimiento de las colonias de actinomicetos en medios sólidos se pueden apreciar a los 3 o 4 días de incubación pero el desarrollo del micelio aéreo

maduro con esporas puede tardar entre 7 a 14 días en desarrollarse, y en algunas cepas de crecimiento lento hasta más de un mes de incubación (Bergey *et al.*, 2000).

El crecimiento en medios líquidos estacionarios se restringe a la formación de una película en la superficie o quizás un sedimento algodonoso dejando el medio líquido transparente. Por lo cual para el crecimiento en medio líquidos se recomienda agitación a velocidades como 200 o 250 rpm para suministrar la mejor aireación posible (Ben-Omar *et al.*, 1997).

### **2.6.3 Ecología y distribución**

Los actinomicetos son microorganismos muy ubicuos que se encuentran en la gran mayoría de sustratos naturales, estando ampliamente distribuidos en los ecosistemas naturales y tienen gran importancia en la participación de la degradación de la materia orgánica, además de ciertas propiedades fisiológicas que los hacen particulares (Ghanem *et al.*, 2000).

En el suelo se encuentran en casi todos los tipos y bajo condiciones extremas disminuyen levemente la concentración de su población. Su número varía en gran proporción según el caso, pero es común encontrarlos en suelos fértiles con concentraciones de  $10^6$  ufc/g de suelo seco. Por lo general se aíslan cepas de actinomicetos en la superficie del suelo y en profundidades entre 2 y 15 cm, más allá de esta profundidad disminuye la cantidad de estos. El tamaño de la comunidad depende del tipo de suelo, particularmente de algunas de las características físicas, del contenido de materia orgánica y del pH del medio ambiente (Tate, 2000).

### III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### 3.1 Hipótesis

- Los actinomicetos nativos aislados de la rizósfera de *Solanum tuberosum* L. “papa” tienen capacidad de producir metabolitos secundarios estimulantes del crecimiento vegetal, que pueden ser usados como biofertilizantes.

#### 3.2 Objetivos

##### OBJETIVO GENERAL

- Contar con un banco de germoplasma de actinomicetos como potenciales Promotores de Crecimiento Vegetal (PGPR) a partir de muestras de rizósfera de cultivos de papa (*Solanum tuberosum*).

##### OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Aislar actinomicetos nativos de la rizósfera de *Solanum tuberosum* sp. *andigena* “papa” cultivados en la provincia de Andahuaylas, Perú.
- Evaluar la capacidad de los actinomicetos para solubilizar fosfatos, fijar nitrógeno atmosférico, producir ácido indol acético y sideróforos, como requisitos previos para su potencial uso como bioinoculantes.
- Caracterizar fenotípicamente a los actinomicetos con potencial uso como Promotor de Crecimiento Vegetal (PGPR)
- Identificar filogenéticamente actinomicetos seleccionados con potencial aplicación como bioinoculantes.

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Materiales**

#### **4.1.1 Material biológico.**

Muestras de rizósfera de cultivos de *Solanum tuberosum* sp. *andigena* “papa” de la provincia de Andahuaylas – Apurímac, Perú.

### **4.2 Métodos.**

#### **4.2.1 Toma de muestra del suelo rizosférico.**

Para la toma de muestra de suelo rizosférico, se realizaron dos muestreos en los meses de enero y abril del 2014 de áreas de cultivo de la papa (*Solanum tuberosum*) ubicadas en el distrito de San Jerónimo (13°39'6.25"S, 73°21'35.24"O) en la provincia de Andahuaylas, departamento de Apurímac.

Se muestrearon en total 2 campos de los cuales se tomaron dos plantas al azar de cada uno. Las muestras obtenidas estaban conformadas por la raíz y el suelo alrededor de esta, recolectando 200g de cada muestra. Las cuales fueron colocadas en bolsas de polietileno de primer uso, con cierre hermético, trasladándose rápidamente al laboratorio en condiciones asépticas.

#### **4.2.2 Aislamiento y purificación de los actinomicetos.**

Para el aislamiento de actinomicetos, se siguió el procedimiento propuesto por Hayakawa *et al.* (2004) muestras de tierra fueron secadas en una estufa (Memmert UNB300) a 50°C por 1 hora, transcurrido el tiempo se pesó 10 g de la muestra seca y se le agregó 90 mL de solución salina (SS) al 0,85% con

1,5% de fenol, colocando la mezcla en la incubadora (Memmert BE400) por 30 minutos a 30°C.

Al finalizar el tiempo de incubación, se hicieron diluciones en SS al 0,85% (p/v) hasta  $10^{-4}$  y se sembró 0,1 mL de cada dilución por diseminación en Agar Almidón Caseína pH 7,2 (Anexo) según Gurung *et al.* (2009) suplementado con Nistatina (Merck) (50 µg/mL) y Cicloheximide (Merck) (50 µg/mL), para ser posteriormente incubadas a 28°C por 15 días.

Los actinomicetos aislados se conservaron en ceparios de Agar Almidón Caseína con glicerol al 20% (v/v) a -20°C, para su uso en estudios posteriores.

#### **4.2.3 Evaluación *in vitro* de las actividades de los actinomicetos relacionadas al PGPR.**

##### **4.2.3.1 Capacidad para la solubilización de fosfatos.**

Se realizó según la técnica de Vásquez *et al.* (2000). Las cepas aisladas anteriormente y la cepa *Azotobacter sp.*, utilizada como patrón, fueron reactivadas en Caldo Tripticasa Soya (Anexo) por 5 y 2 días respectivamente, hasta llegar a una población de  $10^8$  ufc/mL.

Posteriormente, se sembraron 15 µL de cada cepa en placas con medio Picovskaya suplementado con fosfato tricálcico, evaluando la formación de un halo transparente alrededor de la colonia, el cual indicaría que el fosfato presente en el medio fue solubilizado; y con medio SRSM-1 (Gunmarsson *et al.*, 2004), evaluando la presencia de ácidos orgánicos por la variación de pH

del medio, lo que podría determinar que la solubilización de fosfatos estaría relacionada con la producción de estos ácidos. Las placas fueron incubadas por 20 días a 30°C.

El cálculo del halo de solubilización se realizó mediante la fórmula matemática de la corona circular:  $A = \pi (R^2 - r^2)$ , donde R: radio del halo de solubilización y r: radio de la colonia bacteriana.

#### **4.2.3.2 Capacidad para fijar nitrógeno.**

Se realizó en un medio sólido libre de nitrógeno según Valdés *et al.* (2005).

Las cepas de los actinomicetos y la cepa patrón (*Azotobacter sp.*) fueron sembradas por agotamiento en Agar NFB (Anexo), determinando la capacidad de estos microorganismos para utilizar el N<sub>2</sub> como la única fuente nitrogenada, evaluándose su crecimiento en la superficie del medio. Las placas fueron incubadas a 30°C por 15 días,

#### **4.2.3.3 Producción de ácido indol acético (AIA).**

Para determinar AIA se aplicó el método de Celis & Gallardo (2007). La prueba se hizo inoculando las cepas de los actinomicetos en estudio, previamente sembradas en el medio Agar Almidón Caseína (Anexo), en el medio Caldo B suplementado con triptona (Anexo), estos cultivos fueron incubados a 22°C con agitación de 125 rpm por 15 días.

Transcurrido este tiempo se procedió a centrifugar 5 ml del cultivo a 3 000 rpm por 15min; del sobrenadante se colocó 100 µL en pocillos de placas de ELISA

por duplicado, agregando a cada pocillo 200  $\mu$ L del reactivo de Salkowsky, colocándose posteriormente en oscuridad durante 15 minutos.

Para la lectura se tomó en cuenta el viraje de color, de cada pocillo, de amarillo a diversas tonalidades de fucsia como resultado positivo para la presencia de AIA; Posteriormente, realizándose la lectura en el espectrofotómetro (UNICO UV2102C) mediante la absorbancia a 530nm de las cepas positivas. El blanco de la lectura se preparó con medio de cultivo esteril y para el control positivo se utilizó un cultivo de *Azotobacter sp.*

#### **4.2.3.4 Producción de sideróforos.**

De las cepas que crecieron en el medio Agar Almidón Caseína (Anexo) se inocularon por triplicado en el medio descrito por Simon & Tesson (1963) (Anexo) y se incubaron a 22°C con agitación a 250 rpm por 15 días.

Se centrifugó 5 ml del cultivo a 4 000 rpm por 6min, colocando 100  $\mu$ L del sobrenadante de cada cultivo con 100  $\mu$ L de la solución de 5mM de perclorato férrico (SIGMA-ALDRICH) en 0.14 M de ácido sulfúrico, la lectura cualitativa se determinó por el cambio de color de la mezcla anterior a un café rojizo.

Con las cepas positivas se realizó la evaluación cuantitativa con el espectrofotómetro (UNICO UV2102C) mediante la absorbancia a 480 nm según la metodología recomendada por Atkin (1970). El blanco de la lectura se preparó con medio de cultivo esteril y el control positivo de reacción se realizó con una solución patrón de sideróforos.

#### **4.2.4. Caracterización fenotípica de las cepas aisladas**

##### **4.2.4.1 Crecimiento a diferentes temperaturas**

En placas de Agar Tripticasa Soya (TSA) (Anexo) y Agar Nutritivo (AN) (Anexo) se sembraron 15  $\mu$ L ( $10^6$  ufc/mL) de un cultivo de 5 días de las cepas AND 13 y AND 16 (previamente seleccionadas), por duplicado, incubándose a diferentes temperaturas: 5, 20, 30, 37 °C, tomando como control la cepa incubada a 28 °C. La evaluación se realizó cada 48 horas durante 5 días comprobando así el crecimiento y la adaptabilidad de cada aislamiento a las diferentes temperaturas a las que se enfrenta el cultivo de papa en el Perú (Calvo, 2008).

##### **4.2.4.2 Crecimiento a diferentes pH**

En placas con TSA y AN regulado a diferentes gradientes de pH se sembraron 15  $\mu$ L ( $10^6$  ufc/mL) de cultivo de 5 días de las cepas AND 13 y AND 16 por duplicado. Ambos medios fueron regulados a pH 5, 6, 7 (control) y 8. El crecimiento de las bacterias se evaluó diariamente por 8 días con el objetivo de determinar su capacidad adaptativa a suelos de pH bajo que se presentan en algunas zonas alto andinas (Calvo, 2008).

#### **4.2.5. Confirmación del género de las cepas PGPR por medio de Caracterización Bioquímica**

La identificación del género de las cepas PGPR se llevó a cabo a través de pruebas bioquímicas convencionales comparando los resultados con características bioquímicas de actinomicetos anteriormente reportados (MacFaddin, 2000).



Las pruebas utilizadas fueron las siguientes.

#### **4.2.5.1 Prueba de la Oxidasa**

Esta prueba permite saber si los actinomicetos en estudio presentan el complejo citocromo oxidasa. Por lo que con un asa de siembra se colocó una colonia de los actinomicetos en estudio en tiras de Bactident Oxidasa. Si la zona de reacción se coloreaba de azul o violeta azulado el resultado se consideraba positivo.

#### **4.2.5.2 Prueba de la Catalasa**

Se utilizó para determinar la presencia de la enzima catalasa, que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias que contienen citocromo. Para ello, las colonias de los actinomicetos fueron colocadas en una gota de Peróxido de Hidrógeno al 30% (v/v). Si como resultado de la reacción se producían pequeñas burbujas, esta se consideraba positiva (Bailón, 2003).

#### **4.2.5.3 Reducción de Nitratos**

Algunos Actinomicetos tienen la capacidad de reducir nitratos a nitritos. Esta es una característica utilizada para la identificación y diferenciación de muchas especies (Bailón, 2003). Para poner en manifiesto esta capacidad, los actinomicetos en evaluación fueron inoculados en Caldo Nitrato y se incubaron a 28°C durante 7 días. Transcurrido este tiempo se evaluó la capacidad reductora de Nitratos con la adición de 3 gotas de  $\alpha$ -naftilamina y 3 gotas de ácido sulfanílico observando como resultado positivo una coloración roja a los 30 segundos (MacFaddin, 2000).

#### **4.2.5.4 Hidrólisis de Urea**

Se realizó para evidenciar la actividad de la enzima ureasa que poseen ciertos microorganismos, que permite degradar la urea en dos moléculas de amoníaco. Por lo que, las colonias de actinomicetos se inocularon en Caldo Urea (Anexo) y se incubaron a 28°C durante 7 días. Si el medio se tornaba rosa fucsia, el resultado era considerado positivo (Bailón, 2003).

#### **4.2.5.5. Prueba de la Caseína**

Esta prueba se utilizó para comprobar la actividad proteolítica de los actinomicetos. Para ello, se sembraron las colonias por punción en Agar Caseína (Anexo), incubándose a 28°C durante 7 días. Al transcurrir los días de incubación, la presencia de un halo transparente alrededor de la colonia fue considerado positivo (Bailón, 2003).

#### **4.2.5.6. Hidrólisis de Gelatina**

La hidrólisis de gelatina determina la capacidad de un organismo de producir la enzima gelatinasa. El catabolismo de las proteínas por las gelatinasas se da en dos etapas la primera origina polipéptido y posteriormente estos se desdoblan en aminoácidos individuales, (Bailón, 2003). Para evidenciar esta capacidad las colonias fueron inoculadas por punción en el Medio Gelatina (Anexo), incubándose a 28°C durante 10 días. Transcurrido el tiempo, se llevaron los tubos a refrigeración durante 15 min, para luego observar la consistencia del medio, si este se mantiene líquido indica la presencia de enzimas proteolíticas (MacFaddin, 2000).

#### **4.2.6. Identificación molecular de los actinomicetos PGPR**

La identificación de la cepa AND 13, con resultados positivos para todas las pruebas como PGPR, se llevo a cabo de acuerdo a la metodología propuesta por Cook & Meyer (2003). Esta prueba se realizó en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular – Universidad Nacional de la Patagonia, Argentina.

El cultivo se centrifugó a 12000g a 4°C durante 5 min y el ADN genómico se extrajo utilizando el kit comercial de purificación Wizard Genomics (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU) siguiendo las instrucciones del fabricante. Mediante la reacción de PCR se amplificó el gen que codifica 16S ARNr con un termociclador Multigene Gradient (Labnet International Inc., Woodbridge, NJ, EE.UU.), usando los cebadores universales para procariotas 27f (5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG- 3') y 1492r (5'- GGT TAC CTT GTT ACG ACT T - 3', según lo describe DeLong (1992). Ambas hebras de los productos de PCR se secuenciaron utilizando los servicios comerciales de MacroGen Inc. (Seúl, Corea). Las secuencias obtenidas se compararon con las depositadas en la base de datos del NCBI utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). El árbol filogenético fue elaborado usando los algoritmos de Neighbor – Joining implementados en el programa ARB con porcentajes de similitud > a 99%.

## **V. RESULTADOS**

### **5.1 Aislamiento y purificación de los actinomicetos.**

Se logró aislar un total de 49 cepas de Actinomicetos. El aislamiento se obtuvo luego de 2 a 3 siembras sucesivas de las colonias en Agar Almidón Caseína (AC) hasta obtener colonias puras, tomándose en cuenta para la caracterización morfológica la presencia de micelio base y micelio aéreo corto así como la pigmentación de ambos; la textura seca típica y el olor a tierra húmeda, características de estas colonias de actinomicetos.

Todos los actinomicetos aislados presentaron micelio aéreo con variada pigmentación que va desde blanco, crema hasta marrón y morado. Del mismo modo el micelio base de los actinomicetos presentó diferente pigmentación como verde, marrón, rosado y morado; sin embargo algunas cepas no presentaron pigmentación en el micelio base. En cuanto a la textura, todos presentaron una textura seca, típica de los actinomicetos (Tabla 2).

### **5.2 Evaluación *in vitro* de las actividades de los actinomicetos relacionadas al PGPR.**

#### **5.2.1 Solubilización de fosfatos.**

De las 49 cepas evaluadas de actinomicetos, el 63,27% presentó halos de solubilización en el medio Picovskaya (Tabla 3), cuyos valores se muestran entre 0,02 y 0,06 cm<sup>2</sup>, siendo la cepa AND 27 la que presentó mayor área de solubilización (Tabla 4).

**TABLA 2.** Características culturales de las cepas rizosféricas de actinomicetos aisladas de *Solanum tuberosum* del distrito de San Jerónimo - Andahuaylas – Perú, 2014.

Actinomicetos	Micelio aéreo	Color del micelio aéreo	Color reverso de la colonia	Actinomicetos	Micelio aéreo	Color del micelio aéreo	Color reverso de la colonia
AND 1	+	Crema	Marrón tenue	AND 27	+	Blanco	Crema
AND 2	+	Crema	Rosáceo	AND 28	+	Blanco	Crema
AND 3	+	Verduzco	Beige	AND 29	+	Crema	Beige
AND 4	+	Beige	Marrón claro	AND 30	+	Marrón claro	Grisáceo
AND 5	+	Crema	Marrón claro	AND 31	+	Blanco	Crema
AND 6	+	Crema	Marrón claro	AND 32	+	Blanco	Crema
AND 7	+	Blanco grisáceo	Grisáceo	AND 33	+	Blanco	Crema
AND 8	+	Blanco	Verduzco claro	APW 1	+	Blanco grisáceo	Marrón claro
AND 9	+	Blanco	Verduzco tenue	APW 2	+	Blanco	Marrón tenue
AND 10	+	Morado	Morado	APW 3	+	Crema	Marrón claro
AND 11	+	Marrón	Marrón oscuro	APW 4	+	Blanco	Marrón claro
AND 12	+	Blanco grisáceo	Grisáceo	APW 5	+	Blanco	Marrón oscuro
AND 13	+	Blanco	Crema	APW 6	+	Blanco	Marrón oscuro
AND 14	+	Blanco	Amarillo	APW 7	+	Blanco	Marrón oscuro
AND 15	+	Blanco	Amarillo tenue	APW 8	+	Blanco	Marrón tenue
AND 16	+	Blanco	Blanco	APW 9	+	Blanco	Marrón oscuro
AND 18	+	Blanco	Rosáceo	APW 10	+	Beige	Marrón claro
AND 19	+	Blanco	Beige	APW 11	+	Blanco	Crema
AND 20	+	Blanco	Crema	APW 13	+	Blanco	Amarillo tenue
AND 21	+	Crema	Rosáceo	APW 15	+	Blanco	Crema
AND 22	+	Blanco	Rosáceo	APW 16	+	Blanco	Crema
AND 23	+	Blanco	Rosáceo	APW 17	+	Blanco	Marrón oscuro
AND 24	+	Blanco	Rosáceo	APW46b	+	Blanco	Crema
AND 25	+	Blanco	Crema	APW49g	+	Blanco	Crema
AND 26	+	Blanco	Crema				

**TABLA 3.** Capacidad de solubilización de fosfatos de 49 actinomicetos rizosféricos aislados de cultivos de *Solanum tuberosum*.

Actinomicetos	Producción de ácidos orgánicos	Presencia de halos de solubilización	Actinomicetos	Producción de ácidos orgánicos	Presencia de halos de solubilización
AND 1	-	-	AND 27	+	+
AND 2	+	-	AND 28	+	+
AND 3	+	-	AND 29	+	+
AND 4	-	-	AND 30	+	+
AND 5	-	-	AND 31	+	+
AND 6	-	-	AND 32	+	+
AND 7	-	-	AND 33	+	+
AND 8	+	-	APW 1	+	+
AND 9	+	-	APW 2	+	+
AND 10	+	+	APW 3	+	+
AND 11	+	-	APW 4	+	+
AND 12	+	-	APW 5	+	+
AND 13	+	+	APW 6	+	+
AND 14	+	+	APW 7	-	-
AND 15	-	-	APW 8	-	-
AND 16	+	+	APW 9	+	+
AND 18	-	-	APW 10	+	+
AND 19	-	-	APW 11	+	+
AND 20	-	-	APW 13	+	+
AND 21	+	-	APW 15	+	+
AND 22	+	+	APW 16	+	+
AND 23	+	+	APW 17	+	+
AND 24	+	+	APW46b	+	+
AND 25	+	+	APW49g	+	+
AND 26	+	+			

Del total de cepas evaluadas, el 77,55% ocasionaron la variación del pH del medio SRSM-1(Anexo), demostrando que estas cepas producen ácidos, evidenciados por el viraje del indicador púrpura de bromocresol.

Por otro lado, se observó que el halo de solubilización apareció a partir del 4to día de incubación (Tabla 4), incrementando su tamaño hasta el día 15, a partir de este día se mantuvo estable hasta el día 20.

**TABLA 4.** Área de solubilización de los 33 actinomicetos que presentaron la capacidad de solubilizar fosfatos.

Actinomicetos (n=33)	Producción de ácidos orgánicos	Área de solubilización (cm <sup>2</sup> )				
		Día 4	Día 8	Día 10	Día 12	Día 15
AND 10	+	0,01	0,03	0,03	0,04	0,05
AND 13	+	0,01	0,03	0,03	0,03	0,04
AND 14	+	0	0,02	0,02	0,04	0,05
AND 16	+	0,01	0,03	0,03	0,03	0,03
AND 22	+	0	0,03	0,03	0,03	0,03
AND 23	+	0,01	0,03	0,03	0,03	0,04
AND 24	+	0,02	0,03	0,03	0,04	0,05
AND 25	+	0,01	0,03	0,03	0,03	0,03
AND 26	+	0	0,02	0,02	0,02	0,03
AND 27	+	0,02	0,03	0,03	0,04	0,06
AND 28	+	0,01	0,02	0,02	0,03	0,04
AND 29	+	0	0,02	0,02	0,03	0,03
AND 30	+	0	0,03	0,03	0,03	0,04
AND 31	+	0	0,03	0,03	0,03	0,03
AND 32	+	0,01	0,03	0,03	0,04	0,05
AND 33	+	0,02	0,04	0,04	0,04	0,04
APW 1	+	0	0,02	0,02	0,02	0,03
APW 2	+	0,01	0,03	0,03	0,03	0,04
APW 3	+	0,01	0,03	0,03	0,04	0,05
APW 4	+	0	0,02	0,02	0,03	0,03
APW 5	+	0,01	0,03	0,03	0,03	0,04
APW 6	+	0	0,01	0,02	0,02	0,03
APW 9	+	0,01	0,03	0,04	0,04	0,04
APW 10	+	0	0,02	0,02	0,03	0,04
APW 11	+	0	0,03	0,03	0,04	0,05
APW 13	+	0	0,01	0,02	0,02	0,03
APW 15	+	0,01	0,03	0,03	0,03	0,04
APW 16	+	0	0,02	0,02	0,03	0,04
APW 17	+	0	0,02	0,02	0,02	0,02
APW46b	+	0	0,02	0,02	0,02	0,03
APW49g	+	0	0,03	0,03	0,03	0,04

### **5.2.2 Fijación de nitrógeno**

El 85,72% del total de 49 cepas crecieron satisfactoriamente en este medio (Tabla 5), por lo que se puede presumir que las posibles fuentes de nitrógeno alternativo utilizados por los actinomicetos en estudio, se obtendrían a partir de la captación de nitrógeno atmosférico debido a que poseen actividad nitrogenasica.

### **5.2.3 Producción de ácido indol acético (AIA)**

La producción de AIA se determinó por reacciones colorimétricas utilizando el reactivo de Salkowsky (Anexo), el cual es específico para la detección de compuestos derivados del indol. Esta capacidad fue evaluada primero mediante una prueba de carácter cualitativo para todas las cepas (Tabla 6), para posteriormente cuantificar las cepas seleccionadas; basándose en una curva de calibración que se elaboró a partir de patrones de AIA comercial (SIGMA-ALDRICH) diluidos en agua destilada a diferentes concentraciones.

Con los datos obtenidos a partir de la curva de calibración, se obtuvo la ecuación de la recta:  $y = 0,021x + 0,0364$  con un  $r^2=0.9941$  a través de regresión lineal. Considerándose una dispersión adecuada de los valores sobre la recta, por lo que se empleó dicha ecuación como el patrón de referencia para el cálculo de las concentraciones de AIA producidas por las cepas evaluadas.



**TABLA 5.** Capacidad fijadora de nitrógeno de 49 cepas de actinomicetos aislados de la rizósfera de cultivos de *Solanum tuberosum*.

Actinomicetos	Lecturas (días)				Actinomicetos	Lecturas (días)			
	1ra (6)	2da (9)	3ra (12)	4ta (15)		1ra (6)	2da (9)	3ra (12)	4ta (15)
AND 1	+	+	+	+	AND 27	+	+	+	+
AND 2	+	+	++	++	AND 28	+	+	+	+
AND 3	-	-	-	-	AND 29	+	++	++	+
AND 4	+	+	++	++	AND 30	+	++	++	+
AND 5	+	+	++	++	AND 31	+	+	+	+
AND 6	+	++	++	++	AND 32	-	-	-	-
AND 7	+	+	+	++	AND 33	+	+	+	+
AND 8	+	+	+	+	APW 1	+	+	+	+
AND 9	-	-	-	-	APW 2	+	+	+	+
AND 10	-	-	-	-	APW 3	+	+	+	+
AND 11	++	++	++	++	APW 4	+	+	++	++
AND 12	+	+	++	++	APW 5	+	+	+	+
AND 13	+	+	+	+	APW 6	-	-	-	-
AND 14	+	+	+	+	APW 7	-	-	-	-
AND 15	+	+	+	+	APW 8	+	+	+	+
AND 16	+	++	++	++	APW 9	+	+	++	++
AND 18	+	+	+	+	APW 10	+	+	++	++
AND 19	+	+	+	+	APW 11	-	+	+	+
AND 20	+	+	+	+	APW 13	+	+	+	+
AND 21	+	+	+	+	APW 15	+	++	++	++
AND 22	+	+	+	+	APW 16	+	+	+	+
AND 23	+	++	++	-	APW 17	-	+	+	+
AND 24	-	+	+	+	APW46b	+	+	+	+
AND 25	+	+	+	+	APW49g	-	-	-	-
AND 26	+	+	++	++					

(-): No hubo crecimiento, (+): Poco crecimiento, (++) : Crecimiento regular, (+++): Abundante crecimiento

En la evaluación colorimétrica (cualitativa) se obtuvo que el 20,41% de las 49 cepas cambiaron la coloración del sobrenadante (Tabla 6); esto es debido a la reacción oxidativa ocasionada por el ácido sulfúrico, donde por medio de una transaminación se sustituye un grupo amino por el cloro que proviene del cloruro férrico. Sin embargo, también se pudo observar que las cepas, durante

el periodo evaluado, presentaron una producción mínima de AIA respecto al control (*Pseudomona sp.*).

**TABLA 6.** Evaluación colorimétrica de la capacidad de producción de AIA de las 49 cepas de actinomicetos rizosféricos aislados de cultivos de *Solanum tuberosum* al cabo de 15 días de incubación.

Actinomicetos	Producción de AIA	Actinomicetos	Producción de AIA
AND 1	-	AND 27	-
AND 2	-	AND 28	+
AND 3	-	AND 29	-
AND 4	-	AND 30	-
AND 5	+	AND 32	+
AND 6	+	AND 33	-
AND 7	-	AND 31	-
AND 8	-	APW 1	-
AND 9	-	APW 2	-
AND 10	+	APW 3	-
AND 11	-	APW 4	-
AND 12	+	APW 5	-
AND 13	+	APW 6	-
AND 14	-	APW 7	-
AND 15	-	APW 8	-
AND 16	+	APW 9	-
AND 18	-	APW 10	-
AND 19	-	APW 11	-
AND 20	-	APW 13	-
AND 21	-	APW 15	-
AND 22	+	APW 16	+
AND 23	-	APW 17	-
AND 24	-	APW46b	-
AND 25	-	APW49g	-
AND 26	-		

(-): No hubo coloración, (+): Coloración en el sobrenadante

En la Tabla 7, se observa que la cepa AND 10 obtuvo la mayor concentración de AIA con 9,9 µg/mL, seguida de la cepa AND 13 con 5,5 µg/mL; teniendo un rango de variación de 3,9 µg/mL – 9,9 µg/mL.

**TABLA 7.** Evaluación cuantitativa de la capacidad de producción de AIA de los actinomicetos positivos para la evaluación anterior.

Actinomicetos	Producción de AIA	Absorbancia (530nm)				Concentración (µg/mL)
		Lecturas			Promedio	
		1ra	2da	3ra		
AND 5	+	0,129	0,129	0,129	0,129	4,4
AND 6	+	0,145	0,146	0,147	0,146	5,2
AND 10	+	0,244	0,246	0,243	0,244	9,9
AND 12	+	0,129	0,132	0,131	0,131	4,5
AND 13	+	0,151	0,154	0,152	0,152	5,5
AND 16	+	0,147	0,148	0,148	0,148	5,3
AND 22	+	0,131	0,131	0,130	0,131	4,5
AND 28	+	0,118	0,119	0,118	0,118	3,9
AND 32	+	0,122	0,123	0,123	0,123	4,1
APW 16	+	0,125	0,129	0,127	0,127	4,3

#### 5.2.4 Producción de sideróforos

Se observó que el 24,49% de las cepas evaluadas presentaron un ligero cambio de color (Tabla 8), pudiéndose afirmar que estas cepas tienen la capacidad de producir sideróforos.

Se elaboró la curva patrón de concentraciones conocidas de “DESFERAL” (SIGMA-ALDRICH), sideróforo de tipo desferrioxamina, con la finalidad de utilizar la ecuación de la recta  $y=0,0024x + 0,0115$  con un  $r^2=0,9982$ , obtenida

por regresión lineal, para determinar la concentración de sideróforos producidos por cada cepa evaluada (Tabla 9).

**TABLA 8.** Evaluación colorimétrica de la capacidad de producción de sideróforos de las 49 cepas de actinomicetos rizosféricos aislados de cultivos de *Solanum tuberosum* al cabo de 15 días de incubación.

Actinomicetos	Producción de sideróforos	Actinomicetos	Producción de Sideróforos
AND 1	-	AND 27	-
AND 2	-	AND 28	-
AND 3	-	AND 29	-
AND 4	-	AND 30	+
AND 5	-	AND 31	-
AND 6	+	AND 32	+
AND 7	-	AND 33	+
AND 8	-	APW 1	-
AND 9	+	APW 2	+
AND 10	+	APW 3	-
AND 11	+	APW 4	-
AND 12	+	APW 5	-
AND 13	+	APW 6	-
AND 14	-	APW 7	-
AND 15	+	APW 8	-
AND 16	-	APW 9	+
AND 18	-	APW 10	+
AND 19	-	APW 11	-
AND 20	+	APW 13	-
AND 21	-	APW 15	-
AND 22	+	APW 16	-
AND 23	+	APW 17	+
AND 24	+	APW46b	-
AND 25	-	APW49g	-
AND 26	+		

(-): No hubo coloración, (+): Coloración en el sobrenadante

Al obtener los resultados de la prueba colorimétrica, se separaron las muestras de aquellos actinomicetos positivos para dicha evaluación, realizándose posteriormente la prueba cuantitativa de producción de sideróforos. Al calcular

la concentración de las muestras, se obtuvo que los actinomicetos AND 13 y AND 16 resultaron ser los más representativos, con 1,72 µg/mL y 0,8 µg/mL respectivamente (Tabla 9), siendo el rango de variación de las cepas de 0.07 µg/mL – 1.72 µg/mL.

**TABLA 9.** Evaluación cuantitativa de la capacidad de producción de sideróforos de los actinomicetos positivos para la evaluación anterior.

Actinomicetos	Producción de Sideróforos (Cualitativo)	Absorbancia (480nm)				Concentración (µg/mL)
		Lecturas			Promedio	
		1ra	2da	3ra		
AND 4	+	0,012	0,011	0,012	0,012	0,07
AND 7	+	0,012	0,012	0,012	0,012	0,21
AND 11	+	0,012	0,012	0,012	0,012	0,21
AND 13	+	0,015	0,017	0,016	0,016	1,72
AND 16	+	0,014	0,014	0,013	0,014	0,80
AND 21	+	0,012	0,013	0,013	0,013	0,49
AND 26	+	0,012	0,011	0,012	0,012	0,07
AND 32	+	0,012	0,012	0,012	0,012	0,21
AND 33	+	0,012	0,011	0,012	0,012	0,07
APW 3	+	0,013	0,013	0,012	0,013	0,49
APW 7	+	0,012	0,011	0,012	0,012	0,07
APW 8	+	0,012	0,013	0,010	0,012	0,07

Finalmente, al realizar la comparación de resultados obtenidos en cada evaluación para los actinomicetos aislados a partir de la rizósfera de *Solanum tuberosum*, se elaboró un cuadro resumen con la finalidad de seleccionar a los actinomicetos con mejor rendimiento para todas las pruebas (Tabla 10).

Siendo seleccionadas las cepas AND 13 y AND16 (Tabla 11) por tener la capacidad de solubilizar fosfatos, fijar nitrógeno, producir ácido indol acético (AIA) y sideróforos.

**TABLA 10.** Resumen de resultados de las actividades PGPR de las cepas rizosféricas de actinomicetos aisladas de *Solanum tuberosum* de del distrito de San Jerónimo – Andahuaylas – Perú, 2014.

Actinomicetos	Solubilización de fosfatos	Fijación de nitrógeno	Concentración AIA (µg/mL)	Concentración sideróforos (µg/mL)	Actinomicetos	Solubilización de fosfatos	Fijación de nitrógeno	Concentración AIA (µg/mL)	Concentración sideróforos (µg/mL)
AND 1	-	+	0	0	AND 27	+	+	0	0
AND 2	-	++	0	0	AND 28	+	+	3,9	0
AND 3	-	-	0	0	AND 29	+	+	0	0
AND 4	-	++	0	0,07	AND 30	+	+	0	0
AND 5	-	++	4,4	0	AND 31	+	+	0	0
AND 6	-	++	5,2	0	AND 32	+	-	4,1	0,21
AND 7	-	++	0	0,21	AND 33	+	+	0	0,07
AND 8	-	+	0	0	APW 1	+	+	0	0
AND 9	-	-	0	0	APW 2	+	+	0	0
AND 10	+	-	9,9	0	APW 3	+	+	0	0,49
AND 11	-	++	0	0,21	APW 4	++	++	0	0
AND 12	-	++	4,5	0	APW 5	+	+	0	0
AND 13	+	+	5,5	1,72	APW 6	+	-	0	0
AND 14	+	+	0	0	APW 7	-	-	0	0,07
AND 15	-	+	0	0	APW 8	+	+	0	0,07
AND 16	+	++	5,3	0,8	APW 9	++	++	0	0
AND 18	-	+	0	0	APW 10	++	++	0	0
AND 19	-	+	0	0	APW 11	+	+	0	0
AND 20	-	+	0	0	APW 13	+	+	0	0
AND 21	-	+	0	0,49	APW 15	++	++	0	0
AND 22	+	+	4,5	0	APW 16	+	+	4,3	0
AND 23	+	-	0	0	APW 17	+	+	0	0
AND 24	+	+	0	0	APW46b	+	+	0	0
AND 25	+	+	0	0	APW49g	+	-	0	0
AND 26	+	++	0	0,07					

(-): No posee la capacidad, (+): Posee la capacidad

**TABLA 11.** Capacidad PGPR de las cepas seleccionadas de actinomicetos aislados de la rizósfera de *Solanum tuberosum*

Actinomicetos	Solubilización de fosfatos		Fijación de N <sub>2</sub> atmosférico	Producción de AIA (µg/mL)	Producción de sideróforos (µg/mL)
	Producción de ácidos orgánicos	Área de solubilización (cm <sup>2</sup> )			
AND 13	+	0.04	+	5.5	1.7
AND 16	+	0.03	++	5.3	0.8

### 5.3 Caracterización fenotípica de las cepas con potencial PGPR

#### 5.3.1 Crecimiento a diferentes temperaturas

Se evaluó la capacidad que poseen las dos cepas seleccionadas para crecer a diferentes temperaturas (5, 20, 30, 37 °C) simulando los distintos tipos de climas en donde pueden crecer los cultivos de *Solanum tuberosum*.

Se observó que a 5°C no hubo crecimiento por parte de las cepas evaluadas, sin embargo a 20°C y 37°C las cepas de actinomicetos crecieron de manera satisfactoria (Tabla 12), dicho crecimiento se evidenció a partir de las 72 horas de incubación, tomándose como control positivo el crecimiento de las cepas a 30°C.

#### 5.3.2 Crecimiento a diferentes pH

Se evaluó también la capacidad de crecimiento de los actinomicetos seleccionados a diferentes pH, sembrándose por duplicado en Agar Nutritivo (Anexo) y Agar Trypticase Soya (Anexo), los cuales fueron incubados a 28°C.

Con los resultados de esta evaluación se podría determinar si dichas cepas tienen tolerancia para crecer en suelos ácidos y básicos.

Las cepas sembradas en los medios con pH 5.00 no pudieron crecer; sin embargo, a pH 6.00 y 8.00 las cepas mostraron un buen crecimiento a partir de las 72 horas de incubación (Tabla 12), el crecimiento a pH 7.00 se consideró como control positivo para las cepas evaluadas

**TABLA 12.** Caracterización fenotípica de las cepas AND13 y AND 16.

Actinomicetos	Medio de cultivo	pH				T°			
		5.00	6.00	7.00	8.00	5°C	20°C	30°C	37°C
AND 13	AN	-	++	++	++	-	++	++	++
	TSA	-	+	+	+	-	+	+	+
AND 16	AN	-	++	++	++	-	++	++	++
	TSA	-	+	++	++	-	++	++	+

(-): No hubo crecimiento, (+): Poco crecimiento, (++) : Crecimiento regular; AN (agar nutritio; TSA (agar tripticasa soya).

#### 5.4 Confirmación del género de las cepas PGPR por medio de caracterización Bioquímica.

Se realizó la confirmación de género de la cepa que obtuvo el mejor rendimiento en todas las evaluaciones, de las actividades relacionadas a los microorganismos considerados PGPR, seleccionando a la cepa AND 13, poniendo en manifiesto las vías metabólicas y actividades enzimáticas propias de este actinomiceto.



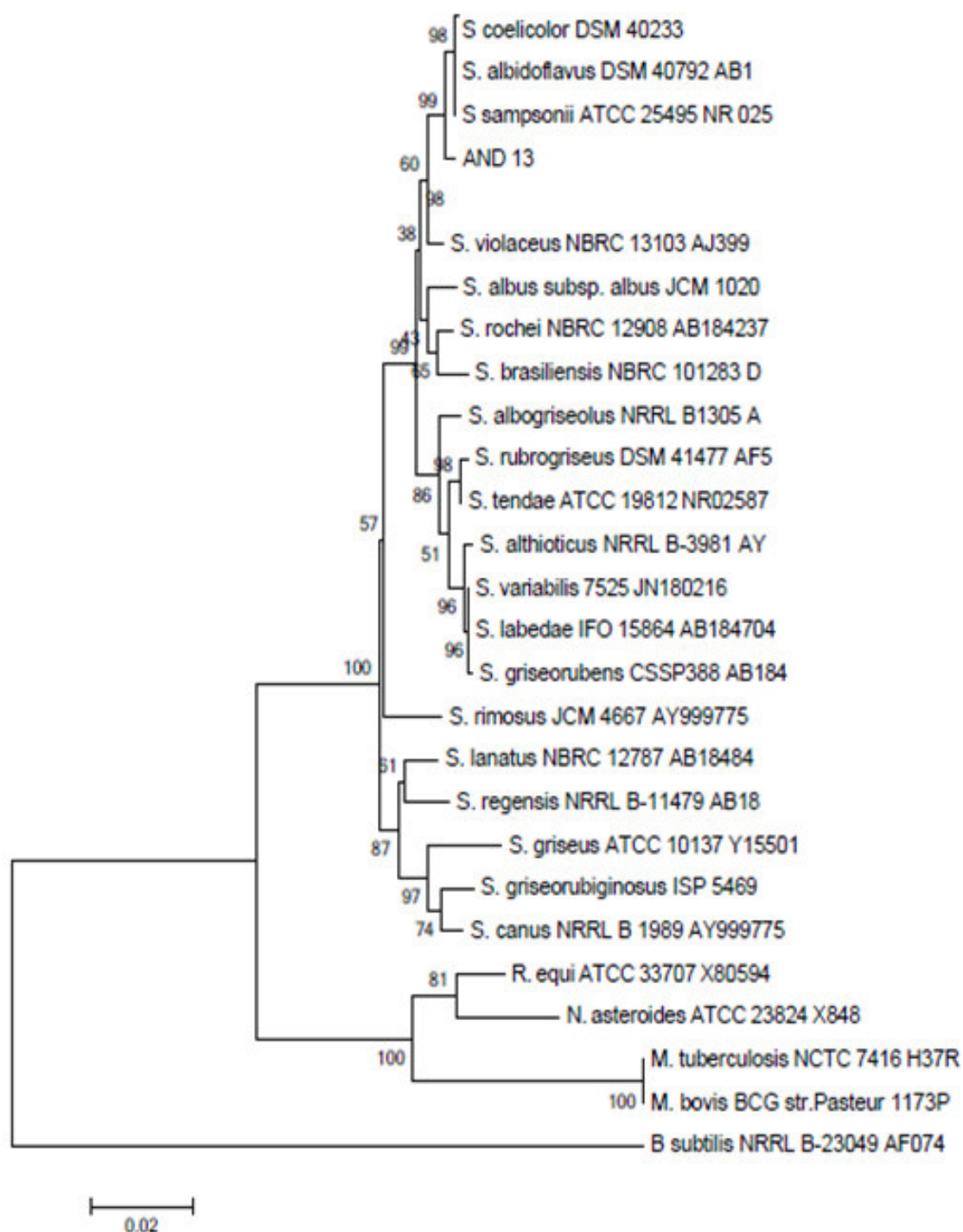
En la Tabla 13 se reportan los resultados obtenidos, los cuales fueron comparados con el comportamiento bioquímico de *Streptomyces sp* según Bergey (2005). De las 6 características analizadas para este género se obtuvo una coincidencia de resultados en 5 análisis. Por lo que se considero que esta cepa pertenece al género *Streptomyces sp*.

**TABLA 13.** Caracterización bioquímica de la cepa AND 13, actinomiceto con mejor capacidad como PGPR.

Cepa	Pruebas bioquímicas					
	Catalasa	Oxidasa	Urea	Gelatina	Nitratos	Caseína
<i>Streptomyces sp</i> (referencia)	+	-	+	+	-	+
AND 13	+	-	-	+	-	+

### 5.5 Identificación molecular de los actinomicetos PGPR

A partir del secuenciamiento del gen RNAr 16S de la cepa AND 13, se obtuvieron 1 292 pares de bases (bp), las cuales fueron comparadas con la base de datos del GenBank, y se halló un porcentaje de similaridad de 99,149% con la especie *Streptomyces sampsonii* (Fig 1).



**Figura 1.** Árbol filogenético de la cepa AND 13, fue construido con el programa Mega versión 6, de acuerdo al método estadístico Neighbor - Joining, presentando su ubicación filogenética en función del análisis de su RNAr 16S. Nivel de similaridad > al 99% a *Streptomyces sampsonii*.

## VI. DISCUSION

En los últimos años, el estudio de la interacción de los actinomicetos a nivel rizosférico ha generado gran interés en los investigadores, para caracterizarlos como PGPR (El Tarabily & Sivasithamparam, 2006). Los actinomicetos tienen la capacidad de sobrevivir a ambientes extremos, hecho que no es común para la mayoría de las bacterias. Además, muchos microorganismos utilizados como biofertilizantes presentan una inestabilidad en cuanto a viabilidad e infectabilidad generados por el estrés medioambiental, mientras que los actinomicetos se propagan mejor bajo condiciones de estrés.

En la presente investigación se aislaron una gran cantidad de cepas (49) provenientes de la rizósfera de *S. tuberosum*. Dichas cepas presentaron características morfológicas típicas de los actinomicetos observándose colonias secas y rugosas con olor a suelo húmedo. Sin embargo, para confirmar que se trataban de actinomicetos, se evaluaron sus características microscópicas, observándose bacterias filamentosas Gram positivas.

Estos resultados son mejores que los obtenidos por Rico (2009) en donde se aislaron en total 45 cepas de actinomicetos rizosféricos de cultivos de papa de 12 localidades muestreadas en 4 diferentes departamentos de Perú.

Persello *et al.* (2003) y Franco (2008) señalan que los actinomicetos, con énfasis en el género *Streptomyces* son considerados promotores del crecimiento vegetal indirecto, puesto que poseen otro tipo de relación con las plantas, debido a la producción de antibióticos y metabolitos secundarios.

Los metabolitos microbianos son fundamentales en las relaciones ecológicas entre microorganismos, siendo muy importante en el caso de los actinomicetos según Lehr *et al.* (2008), es por ello que se realizó la evaluación de la capacidad promotora del crecimiento vegetal (PGPR) a través de diversas pruebas fundamentales para determinar actinomicetos rizosféricos que posean estas características tal y como lo realizan Husen (2003) y Joseph *et al.* (2007) en sus investigaciones.

La capacidad que poseen algunas rizobacterias para solubilizar fosfatos, les permite ser consideradas como bacterias promotoras de crecimiento vegetal, especialmente aquellas que encontramos en suelos con grandes cantidades de fosfato precipitado. Los mecanismos que utilizan estos microorganismos para la solubilización de fosfatos son la producción de ácidos orgánicos y de fosfatasas, sin embargo esto dependerá de la naturaleza del fósforo en el suelo de acuerdo con Whitelaw (2000), Gyaneshwar *et al.* (2002) y Tiesen (2008).

Al evaluar esta característica, se obtuvo que más del 60% de las cepas en estudio presentaron halos de solubilización, sin embargo, estos eran muy pequeños en comparación con los de la cepa patrón, *Azotobacter sp.* Franco (2008) obtuvo resultados similares, teniendo una gran cantidad de actinomicetos solubilizadores de fosfatos con un rendimiento por debajo que el de las bacterias del género *Azotobacter*.

El segundo medio utilizado para la evaluación de la capacidad de solubilización de fosfatos (SRSM-1), poseía un indicador de pH, el cual al virar nos indicaba la producción de ácidos; por lo que, al comparar los resultados obtenidos en

ambos medios se determinó que todas las cepas que produjeron halo de solubilización también pudieron acidificar el medio SRSM-1, demostrando que el mecanismo de solubilización de fosfatos utilizado por dichas cepas se podría relacionar con la producción de ácidos; actuando como quelante para el calcio, aumentando de esta manera la disponibilidad del fósforo en los suelos concordando con Nautiyal (1999) y Sylvia (2005).

Franco (2008) también utilizó ambos medios para evaluar esta característica, obteniendo como resultado que la mayoría de actinomicetos solubilizadores de fosfatos poseen la capacidad de producción de ácidos relacionados con esta actividad; sin embargo, también obtuvo una minoría que no produjeron ácidos, esto puede atribuirse al fosfato utilizado, puesto que no todos los microorganismos tienen la capacidad de solubilizar el fósforo desde fuentes inorgánicas.

Los resultados obtenidos son muy alentadores, debido a que estas cepas pueden ser utilizadas como bioinoculantes en la agricultura, ya que podrían favorecer a la absorción de este nutriente en las plantas, incrementando de manera progresiva su crecimiento.

Por otro lado, Philippot & Germon (2005) señalan que el nitrógeno representa el 78% de los gases que componen la atmósfera; sin embargo esta fuente no se encuentra disponible para las plantas. La principal fuente de este elemento para las plantas la constituye la materia orgánica del suelo (MOS), la cual es oxidada por los microorganismos para liberar el nitrógeno. Sin embargo, Chotte *et al.* (2002) señalan que en suelos con poca cantidad de MOS, este proceso no

proporciona a los cultivos cantidades suficientes de nitrógeno inorgánico, por lo que la fijación de nitrógeno adquiere una gran importancia como fuente de nitrógeno adicional.

En este trabajo se encontraron más del 85% de cepas de actinomicetos con capacidad para fijar nitrógeno, considerando que cada cepa fue sembrada tres veces con la finalidad de evitar que el medio sufra alguna interferencia por trazas de nitrógeno presente en los pases; esta actividad fue reportada inicialmente por Valdés *et al.* (2005) para una cepa de *Streptomyces thermoautotrophicus*, sin embargo esta cepa no estaba asociada a las plantas. Franco (2008) obtuvo un porcentaje menor de actinomicetos rizosféricos con capacidad fijadora de nitrógeno (33.3%), sin embargo esto puede deberse a la cantidad de pases realizado en este estudio. Salazar y Ordóñez (2013), por el contrario, obtuvieron más del 68 % de actinomicetos fijadores de nitrógeno, realizando 4 pases consecutivos. Lo que nos indica que estos actinomicetos poseen actividades metabólicas que les permiten captar el nitrógeno atmosférico que encierra la microatmósfera de la placa petri en que se encuentran y suplir esta necesidad.

El Ácido Indol Acético es la auxina más ampliamente distribuida en las plantas, cuyos efectos incluyen, entre otros, la elongación, el aumento en la respiración celular, la promoción del crecimiento en raíces, estos son factores que favorecen al desarrollo vegetal. Tsavkelova *et al.* (2006), mencionan en su investigación que los más eficientes productores de auxinas son las bacterias habitantes de la rizósfera de las plantas.

Al evaluar las cepas se obtuvo que solo el 20,41% resultaron positivas, cuyo rango de producción de AIA estuvo entre 3,9 µg/ml y 9,9 µg/ml. Estos resultados no son tan alentadores, sin embargo, se debe tomar en cuenta que la evaluación se realizó el día 15, por lo que no se hizo un seguimiento de varios días, a diferencia del trabajo de Rico (2009) que evaluó la producción de AIA al 4to, 8vo, 12do y 15to día, obteniendo una variación entre 6,9 µg/ml y 51,8 µg/ml el 15to día. Sin embargo, es importante tener en cuenta, que si se hace una comparación entre las investigaciones sobre la producción de esta auxina, se demuestra que bajas concentraciones de esta fitohormona son capaces de estimular el desarrollo vegetal y las altas concentraciones inhiben o reducen la zona de alargamiento tal y como lo mencionan Rodríguez *et al.* (2005) y Hernández (2002); teniendo en cuenta que los microorganismos nativos están adaptados a condiciones y ambientes propios, sólo realizando bioensayos “in vitro” se podrá encontrar la dosis adecuada y comprobar el efecto ejercido sobre los cultivos.

Otra limitación que se presenta es la baja disponibilidad de hierro debido a la precipitación o quelación del mismo. Por lo que los sideróforos producidos por microorganismos pueden aumentar o regular la disponibilidad de este elemento en la rizósfera así como también proteger a las plantas de los ataques de algunos patógenos. Para esto, los microorganismos utilizan complejos proteicos que unen y transportan el complejo quelante-hierro hacia el interior de la célula.

En los ensayos de producción de sideróforos solo el 24,49% del total de las cepas fueron positivas, sin embargo, la concentración del mismo fue mínima. A diferencia de Rico (2009) que obtuvo resultados negativos para todos los actinomicetos evaluados, sin embargo, en este estudio se utilizó la prueba Chrome Azurol S (CAS) para determinar la presencia de sideróforos. Por otro lado, Franco (2008) obtuvo resultados positivos para esta evaluación, considerando que se utilizó el mismo medio que el de la presente investigación; sin embargo, también obtuvo bajas concentraciones de este metabolito.

Los actinomicetos AND 13 y AND 16 presentaron un mayor rendimiento en las características analizadas, siendo los resultados de la cepa AND 13 los más alentadores. Pudiéndose emplear estas cepas, a futuro, en el campo como una solución alterna ante el uso excesivo de productos químicos.

Existen tres factores que influyen en la distribución y en la actividad de muchos actinomicetos en el suelo: el pH, la temperatura y el tipo de suelo. Es por eso que en este estudio se evaluó también la capacidad de crecimiento de las cepas AND 13 y AND 16 (cepas seleccionadas como PGPR) a diferentes temperaturas y pH. Los resultados obtenidos coinciden con Stanley (1994), que indica que los actinomicetos no pueden crecer a pH por debajo de 5,0, teniendo en cuenta que el género *Streptomyces* no puede crecer a pH menor a 5,9. Siendo su rango de pH óptimo entre 6,8 - 8,0.

Los actinomicetos al ser mesófilos, crecen mejor a temperaturas entre 25 a 30°C, pero a temperaturas inferiores a 5°C su crecimiento es nulo según Stanley (1994), coincidiendo con los resultados de la evaluación de crecimiento



a diferentes temperaturas. Sin embargo, a pesar de las condiciones de crecimiento establecidas, los actinomicetos son microorganismos que se adaptan a otro tipo de condiciones. Según estudios se afirma que estos microorganismos han sido aislados de diferentes ambientes como praderas, arenas de la playa, cuevas subterráneas, arrozales y subhielo glacial de la Antártida, además Ibrahim *et al.* (2006), Terkina *et al.* (2006) y Jayasinghe & Parkinson (2008) reportaron el crecimiento de dichos microorganismos a temperaturas entre 10,2°C y 2,5°C.

Con la caracterización bioquímica se pudo concluir que la cepa AND13 pertenece al género *Streptomyces*, considerando que éste es uno de los más reconocidos del orden Actinomycetales debido a su amplia distribución en la naturaleza, especialmente en el suelo y porque alberga a un gran número de los productores más importantes de antibióticos y otros metabolitos secundarios según Ramírez *et al.* (2008). Para confirmar los resultados de esta caracterización, se realizó la identificación molecular de la cepa, a través del secuenciamiento de los fragmentos amplificados del gen RNAr 16S , comparándola con las secuencias depositadas en el GenBank a través del programa Clustal 2.1, obteniéndose porcentajes de similitud mayores a 99% con la especie *Streptomyces samposii*.

## VII. CONCLUSIONES

- Se logró aislar una gran cantidad de bacterias del orden Actinomiceto aislados a partir de la rizósfera de *Solanum tuberosum* sp. *andigena* provenientes de la provincia de Andahuaylas en el departamento de Apurímac.
- Se seleccionaron 2 cepas que pueden usarse como promotores de crecimiento vegetal.
- Las dos cepas seleccionadas mostraron gran capacidad de adaptación y crecimiento a diferentes pH (6, 7, 8) así como también a diferentes temperaturas (20°, 30°, 37°C), por lo que podrían ser utilizadas en los diversos suelos donde se cultiva la papa y a estas temperaturas.
- La cepa AND 13, actinomiceto rizosférico con mejor rendimiento en las pruebas como PGPR, fue ubicada filogenéticamente dentro de la especie *Streptomyces sampsonii*.

## VIII RECOMENDACIONES

- Al evaluar la capacidad de los actinomicetos para solubilizar fosfatos, se asoció esta característica a la producción de ácidos orgánicos; sin embargo, no se determinó el tipo de ácido que producen y si este interviene en el tamaño del área de solubilización aumentando el rendimiento de las cepas. Por lo que sería importante aumentar la investigación en este punto.
- Los sideróforos producidos por los microorganismos no son únicamente considerados quelantes del hierro, puesto que también cumplen un papel en el control biológico de las enfermedades de las plantas. Siendo conveniente evaluar la capacidad antagonista de los actinomicetos productores de sideróforos frente a los diferentes microorganismos patógenos del cultivo de la papa.
- Considerando que la cepa AND 13 presenta una buena actividad *in vitro* como PGPR, sería conveniente hacer inóculos de esta cepa en cultivos de papa, evaluando los efectos positivos y negativos que pueden presentar los sembríos a diferentes concentraciones del inóculo.

## IX. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- AGÜERO, A. 2009. Producción de bacterias fijadoras de nitrógeno (Azotobacter, Bacillus y Pseudomonas); en medio líquido a base de melaza, para su aplicación en el cultivo de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) azucarera, el viejo, guanacaste. Tesis Bachiller en Ingeniería en Biotecnología. Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- ALONSO, J. and MÉNDEZ, C. 2001. Mecanismos para incrementar el número de tubérculos. Boletín de la papa. Vol. 3, nº 4.
- ARCE, A. 2002. El cultivo de la patata. Ed. Mundi-Prensa. España. 2da Edición, pp. 41-69.
- ATKIN, C., NEILANDS, J. and PHAFF, H. 1970. Rhodotorulic Acid from Species of *Leucosporidium*, *Rhodosporidium*, *Rhodotorula*, *Sporidiobolus* and *Sporobolomyces*, and a New Alanine-Containing Ferrichrome from *Cryptococcus melibiosum*. Journal of Bacteriology. Vol. 103, nº3, pp. 722-733.
- ATLAS, R. 2002. Ecología microbiana y microbiología ambiental. Pearson Education SA. 4ta edición. Madrid, España, pp. 429-430.
- BAILÓN, L., GOLZÁLEZ, R., CERVANTES, A. 2003. Atlas de Pruebas Bioquímicas para Identificar Bacterias. Universidad Autónoma de México. Facultad de Estudios superiores Zaragoza.
- BEN-OMAR, N., MERROUN, M., ARIAS J. and GONZALEZ M. 1997. Comparative heavy metal biosorption study of Brewery yeast and *Myxococcus xanthus* biomass. Chemosphere. Vol. 35, nº 10, pp. 2217-2283.

- BERGEY. 2005. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Brenner, J. Ed. Springer. New York, USA. Vol. 2.
- BOBADILLA, C. & RINCÓN, S. 2008. Aislamiento y producción de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de compost obtenido de residuos de plaza. Tesis de pregrado en Microbiología industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.
- BODDEY, R. & DÖBEREINER, J. 1995. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent progress and perspectives for the future. Fertilizer Research. Vol. 42, pp. 241 -250.
- BOLAÑOS, M., ARANZAZU, F., CELIS, L., MORALES, H., and ZULUAGA, L. 2002. Fertilización e Incidencia de Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis morelet*) en plátano dominico-hartón (*MUSA AAB*) en Armenia, Colombia. Acorbat. Memorias XV Reunión. Asociación de Bananeros de Colombia. Cartagena de Indias, Colombia.
- CALVO, P. 2008. Capacidad PGPR de Bacterias del genero *Bacillus* aisladas de la rizosfera del cultivo de Papa (*Solanum tuberosum*) en los Andes del Perú. Tesis para optar el Título de Biólogo. Lima – Perú.
- CADENAS PRODUCTIVAS AGRICOLAS DE CALIDAD (CAPAC). 2008. Centro de acopio de papa: Factibilidad de promover e implementar este concepto en la sierra peruana. Lima, Perú.
- CARRASCO, J. 2015. "Perú producirá 4,7 millones de toneladas de papa en esta campaña". Agencia agraria de noticias.
- CASTELLANOS, D., CUBILLOS, R., ARGÜELLO, H. 2009. Selección de microorganismos promotores de crecimiento vegetal (ácido indol acético) a partir de muestras de suelo rizosférico, como primera etapa en el

desarrollo de un biofertilizante. Revista Brasileira de Agroecología. Vol. 4, nº 2, pp. 1720-1723.

- CVALETTI, L., MONCIARDINI, P., BAMONTE, P. and SCHUMANN, P. 2006. New lineage of filamentous, spore-forming, gram-positive bacteria from soil. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 72, pp. 4360-4369.
- CELIS, J. and GALLARDO I. 2007. Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (ácido indol acético, giberelinas) en cultivos microbianos. Microbiología Industrial, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
- CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA (CIP). 2012. Biodiversidad agrícola de la papa.
- CHINCHOLKAR, S. & MUKERJI, K. 2007. Biological Control of Plant Diseases. Eur J Plant Pathol. Vol. 119, pp. 481-483.
- CHOTTE, J., SCHWARTSMANN, A., BALLY, E. and MONROZIER, L. 2002. Changes in bacterial communities and *Azospirillum* diversity in soil fractions of a tropical soil under 3 or 19 years of natural fallow. *Soil Biol. Biochem.* Vol. 34, pp. 1083-1092.
- COMPANT, S., REITER, B., SESSITSCH, A., NOWAK, J., CLEMENT, C., BARKA, E. 2005. Endophytic Colonization of *Vitis vinifera* by Plant Growth-Promoting Bacterium *Burkholderia* sp. Strain PsJN. Appl Environ. Microbiol. Vol. 71, nº 4, pp. 1685-1693.
- COOK, A. and MEYERS, P. 2003. Rapid identifications of filamentous actinomycetes to the genus level using genus-specific 16S rRNA gene

restriction fragment patterns. International J. of Systematic and Evolutionary Microbiol. Vol. 53, pp. 1907-1915.

- CROWEL, D., WANG, Y., REID, C., SZANISZLO, P. 1991. Mechanisms of iron acquisition from siderophores by microorganisms and Plants. Plants Soil. Vol. 130, pp. 179-198.
- EL-TARABILY KA & SIVASITHAMPARAM K. 2006. Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. Soil Biol Biochem. Vol. 38, pp. 1505-1520.
- EVANGELISTA, M. and MORENO, E. 2007. Metabolitos secundarios de importancia farmacéutica producidos por actinomicetos. Bio Tecnología. Vol. 11, nº 3.
- EZZIYYANI, M., PÉREZ, C., REQUENA, M., AHMED, A. and CANDELA, M. 2004. Evaluación del biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annum* L.) por tratamiento con *Burkholderia cepacia*. Anales de Biología. Vol. 26, pp.61-68.
- FAO. 2008. La Papa, Nutrición Y Alimentación - Año Internacional de La Papa, <http://www.fao.org/potato-2008/es/lapapa/hojas.html>.
- FAOSTAT. 2014. World - Top 25 Potato Producing Countries. PotatoPro, <http://www.potatopro.com/world/potato-statistics>.
- FERNÁNDEZ, C. 1988. Vida microbiana en el suelo. Ed. Pueblo y Educación. Habana, pp. 306-331.
- FRANCO, M. 2009. Utilización de los actinomicetos en procesos de biofertilización. Bogotá D.C.

- FRANCO, M. 2008. Evaluación de caracteres PGPR en Actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas. Tesis para optar el Grado de Doctor. Universidad de Granada. Facultad de Ciencias. Granada, España.
- GALINDO, T., POLANÍA, J., SÁNCHEZ, J., MORENO, N., VANEGAS, J. and HOLGUÍN, G. 2006. Efecto de inoculantes microbianos sobre la promoción de crecimiento de plántulas de mangle y plantas de *Citrillus vulgaris*. San Andrés Isla, Colombia. *Acta Biológica Colombiana*. Vol. 11, n° 1, pp.83-97.
- GHANEM, N., SABRY, S., EL-SHERIF, Z. and EL-ELA, A. 2000. Isolation and Enumeration of marine Actinomicetes from seawater and sediments in Alexandria. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 46, pp. 105-111.
- GLICK, R. 1995. The enhancement of plant growth by free- living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. Vol. 41, pp. 109-117.
- GUNMARSSON, N., MORTENSEN, U.K., SOSIO, M. and NIELSEN J. 2004. Identification of Entner Doudoroff pathway in an antibiotic-producing actinomycetes species. *Molec. Microbiol.* Vol. 52, n° 3, pp. 895-902.
- GURUNG, T., SHERPA, C., PRASAD, V. and LEKHAK, B. 2009. Isolation and characterization of Antibacterial Actinomycetes from Soil Samples of Kalapatthar, Mount Everest Region. *Nepal Journal of Science and Technology*. Vol.10, p.173-182.



- GYANESHWAR P., KUMAR G.N., PAREKH L.J., POOLE P.S. 2002. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant Soil*. Vol. 245, p.83-93.
- HAYAKAWA, M., YOSHIDA, Y. and IIMURA, Y. 2004. Selective Isolation of Bioactive Soil Actinomycetes Belonging to the *Streptomyces violaceusniger* Phenotypic Cluster. *Journal of Applied Microbiology*. Vol 96, nº 5, pp. 973–981.
- HERNÁNDEZ A. 2002. Obtención de un biopreparado a partir de rizobacterias asociadas al cultivo del maíz (*Zea mays L.*). Tesis de doctorado. Universidad de La Habana.
- HIGA, T. and PARR, J. 1994. Benefical and Effective microorganism for a Sustainable Agriculture and Environment. *International Nature Farming Research Center*. Japan. pp. 2-26.
- HORTON, D. 1992. La papa: Producción, comercialización y programas. Copublicacion de Centro Internacional de la Papa (CIP) y Hemisferio Sur. Lima, Perú.
- HUSEN, E. 2003. Screening of soil bacteria for plant growth promotion activities in vitro. *Indonesian Journal of Agricultural Science*. Vol. 4, pp. 27-31.
- IBRAHIM, E., ARENSKOTTER, M., LUFTMANN, H. and STEINBUCHER, A. 2006. Identification of Poly (cis-1,4-Isoprene) Degradation Intermediates during Growth of Moderately Thermophilic Actinomycetes on Rubber and Cloning of a Functional lcp Homologue from *Nocardia farcinica* Strain E1. *Applied and Environmental Microbiology*. Alemania. Vol. 72, pp. 3375–3382.

- INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA E INFORMÁTICA. 2014. Nota de prensa -Producción de papa creció 4,5%.
- JAIZME-VEGA, M., RODRÍGUEZ-ROMERO, A., PIÑERO, M. 2003. Potential use of rhizobacteria from the *Bacillus* genus to stimulate the plant growth of micropropagate banana. *Fruits*. Vol. 59, nº 2, p. 83-90.
- JAYASINGHE, D. & PARKINSON, D. 2008. Actinomycetes as antagonists of litter decomposer fungi. *Applied Soil Ecology*. Canadá, nº38, pp. 109-118.
- JOSEPH, B., RANJAR, R. and LAWRENCE, R. 2007. Characterization of plant growth promoting rizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). *International Journal of Plant Production*. Vol. 2, pp.141-151.
- KLOEPPER, J., LIFSHITZ, R. and ZABLOTOWITZ, R. 1989. Free living bacteria inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnology*. Vol. 7, pp. 39-43.
- LEHR N.A., SCHREY S.D., HAMPP R., TARKKAM.T. 2008. Root inoculation with a forest soil streptomycete leads to locally and systemically increased resistance against phytopathogens in Norway spruce. *New Phytologist*.
- MACFADDIN. 2000. *Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria*. 3th Edition. Lippincott Williams & Wilkins, Inc. Estados Unidos.
- MAHMOUD, S. RAMADAN, E., THABET, F. and KHATER, T. 1984. Production of plant growth promoting substances by rhizosphere microorganisms. *Zlb. Mikrobiologiya*. Vol. 139, pp. 227-232.

- MANULIS, S., SHAFRIR, H., EPSTEIN, E., LICHTER, A. and BARASH I. 1994. Biosíntesis of indole-3-acetic acid via the indole-3-acetamide pathway in *Streptomyces* spp. Microbiology. Vol. 140, pp. 1045-1050.
- MEJÍA, G., & GÓMEZ, J. 2009. Los desechos generados por la industria bananera en Colombia. Seminario internacional gestión ambiental de residuos sólidos y peligrosos.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA. 2006. La Papa: de los andes para el mundo. Boletín del Estudio de Rentabilidad. Edición Especial nº 7.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA Y RIEGO. 2011. Cadena agroproductiva de la papa. Manejo y fertilidad de suelos. Guía técnica de orientación al productor.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA Y RIEGO. 2012. La papa: Principales Aspectos de la Cadena Productiva. 1ra Edición.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA Y RIEGO. 2013. Principales Aspectos agroeconómicos de la Cadena Productiva de la papa. 1ra edición.
- MORDUKHOVA, E., SKVORTSOVA, V., KOCHETKOV, A., DUBEIKOVSKI, A. and BORONIN., A. 1991. Sybthesis of the phytohormone indole -3-acetic acid by rhizosphere bacteria of the genus *Pseudomonas*, pp. 494-500.
- NAUTIYAL, C. S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate-solubilizing microorganisms. FEMS Microbiology Letters. Vol. 170, pp. 265 – 270.
- NEILAND, J. 1995. Siderophores: Structure and function of a microbial iron transport compounds. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 270, pp. 26723-26726.

- ORDINOLA, M. 2014. Perú: Primer productor de papa en América Latina. Entrevista PUCP.
- PEREZ, N. 2004. Control biológico de patógenos vegetales. Manejo ecológico de plagas. Vol.7, pp.231-247.
- PERSELLO, F., NUSSAUME, L. & ROBAGLIA, C. 2003. Tales from the underground: molecular plant – rhizobacteria interactions. Plant, Cell and Environment. Vol. 26, pp.189-199.
- PHILIPPOT, L. & J.C. GERMON. 2005. Contribution of bacterial to initial input and cycling of nitrogen in soils. Springer, Nueva York, EEUU, pp. 159-176.
- RAMÍREZ, M., ROVEDA, G., BONILLA, R., CABRA, L., PEÑARANDA, A., LÓPEZ, M., *et. al.* 2008. Uso de Microorganismos con potencial como Biofertilizantes en el Cultivo de Mora. Editorial Produmedios, Bogotá, Colombia. 1ra Edición, pp. 34-35.
- RICO, M. 2009. Capacidad promotora de crecimiento vegetal por bacterias del género *Azotobacter* y Actinomicetos aislados de cultivos de *Solanum tuberosum* Linnaeus, 1753 (Papa) cultivados en zonas altoandinas del Perú. Tesis de pregrado en Biología. Facultad de Ciencias Biológica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima.
- RIVERA-CRUZ, M., TRUJILLO, A., CÓRDOVA, G., KOHLER, J., CARAVACA, F., ROLDÁN, A. 2008. Poultry manure and banana waste are effective biofertilizer carriers for promoting plant growth and soil sustainability in banana crops. Soil Biology & Biochemistry. Vol. 40, pp. 3092-3095.

- RODRIGUEZ, A., TRUJILLO, I., BRINGAS, Y., ROJAS, M., MANZANO, J., HEYDRICH, M. 2005. Caracterización fisiológica de la comunidad microbiana endofítica de la caña de azúcar. *Revista Colombiana de Biotecnología*. Vol. 7, pp. 66-75.
- ROÂZCYCKI, H., DAHM, H., STRZELCZK, E., LI, C.Y. 1999. Diazotrophic bacteria in root-free soil and in the root zone of pine (*Pinus sylvestris* L.) and oak (*Quercus robur* L.). *Applied Soil Ecology*. Vol. 12, pp. 239-250.
- SALAZAR, A. & ORDÓÑEZ, C. 2013. Aislamiento e identificación de actinomicetos fijadores de nitrógeno en suelo del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira. Colombia.
- SCHER, F. & BAKER, R. 1982. Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* with pathogens. *Phytopathology*. Vol. 72, pp. 1570 – 1573.
- SIMON, P. & TESSMAN, I. 1963. Thymidine-requiring mutants of phage T4. *Proc Natl. Acad Sci. USA*. Vol. 50, pp. 526-532.
- SOLANO R. 2000. Estudio de la capacidad de dos cepas bacterianas del género “Baillus” para promover el crecimiento vegetal. Universidad San Pablo CEU, Tesis doctoral. Madrid.
- SOUSA, C., FERMINO, A., and GARRIDO M. 2008. Characterization of *Streptomyces* with potential to promote plant growth and biocontrol. *Scentia Agricola*. Vol. 65, nº 1, pp. 50-55.
- STANLEY Y. 1994. The Family Streptomycetaceae. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Ed. Williams & Wikins. Baltimore USA. Vol. 4, pp. 605-669.

- SYLVIA, DM. 1998. Principles and application of soil microbiology. Prentice Hall. Seattle River, NJ.
- SYLVIA, D. 2005. Principles and applications of soil microbiology. Second Edition. Pearson/ Prentice Hall. New Jersey, USA, pp. 259 – 306.
- TATE, R. 2000. Soil Microbiology. Second Ed. Wiley, New York, USA, pp. 47-56.
- TAURIAN, T., ANZUAY, M., ANGELINI, G., TONELLI, M., LUDUEÑA, L., PENA, D., IBÁÑEZ, F., and FABRA, A. 2010. Phosphate-solubilizing penaut associated bacteria: screening for plant growth-promoting activities. Plant and Soil. Vol. 329, pp. 421-431.
- TERRY, E., LEYVA, A., and HERNÁNDEZ, A. 2005. Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo del tomate (*Lycopersicum esculentum*, Mill). *Revista Colombiana de Biotecnología*. Vol. 7, nº 2, pp. 47-54.
- TERKINA, I., PARFENOVA, V. and AHN, T. 2006. Antagonistic Activity of Actinomycetes of Lake Baikal. Applied Biochemistry and Microbiology. Japón, nº 42, pp. 195–199.
- TIEN, T., GASKINS, M. and HUBBELL, D. 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). Applied Environmental Microbiology. Vol. 37, pp. 101-1024.
- TIESEN, H. 2008. Phosphorus in the global environment. En: The ecophysiology of plant-phosphorus interactions. PH White, JP Hammond, pp.1-7.

- TITUS, A. and PEREIRA, G. 2007. The role of Actinomycetes in coffee plantation ecology.
- TSAVKELOVA, E., YU, KLIMOVA, S., CHERDYNTSEVA, T. and NETRUSOV, A. 2006. Microbial Producers of Plant Growth Stimulators and Their Practical Use: A Review. Applied Biochemistry and Microbiology. Vol. 42, pp. 117-126.
- VALDES, M., PEREZ, N., ESTRADA, P., CABALLERO, J., PEÑA, J., NORMAND, P. and HIRSCH, A. 2005. Non-*Frankia* Actinomycetes Isolated from Surface-Sterilized Roots of *Casuarina equisetifolia* Fix Nitrogen. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 71, nº 1, pp. 445-446.
- VÁSQUEZ, P., HOLGUIN, C. and PUENTE, M. 2000. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with rhizosphere of mongroves in a semiarid coastal lagoon. Biol. Fertl. Soils. Vol. 30, pp. 460-468.
- WHITELOW, M. 2000. Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. Academic press. Advances in Agronomy. Vol. 69, p. 99-151.
- ZEHR, J., JENKINS, B., SHORT S. and STEWARD, G. 2003. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. Environ. Microbiol. Vol. 5, p. 539-554.

## XI. ANEXOS

### ANEXO 1: TABLAS

**TABLA 14.** Curva patrón de la concentración del AIA comercial (SIGMA-ALDRICH).

Concentración (µg/ml)	Absorbancia (530nm)				Desviación estándar	Coeficiente de variación
	Lecturas			Promedio		
	1ra	2da	3ra			
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,00000	0,00000
2	0,067	0,066	0,063	0,065	0,00208	3,18622
5	0,126	0,129	0,128	0,128	0,00153	1,19649
10	0,261	0,26	0,259	0,260	0,00100	0,38462
15	0,379	0,382	0,384	0,382	0,00252	0,65937
20	0,481	0,481	0,48	0,481	0,00058	0,12011
30	0,692	0,693	0,695	0,693	0,00153	0,22032
40	0,882	0,889	0,892	0,888	0,00513	0,57810
50	1,042	1,039	1,035	1,039	0,00351	0,33811

**TABLA 15.** Curva patrón de la concentración del sideróforos comercial “DESFERAL” (SIGMA-ALDRICH).

Concentración (µg/mL)	Absorbancia (480nm)				Desviación estándar	Coeficiente de variación
	Lecturas			Promedio		
	1ra	2da	3ra			
0	0	0	0	0,000	0,00000	0,00000
2	0,026	0,024	0,024	0,025	0,00115	4,68122
6	0,052	0,052	0,051	0,052	0,00058	1,11745
8	0,132	0,133	0,130	0,132	0,00153	1,16015
15	0,266	0,267	0,267	0,267	0,00058	0,21651
20	0,510	0,512	0,511	0,511	0,00100	0,19569
30	0,782	0,783	0,782	0,782	0,00058	0,07380
40	0,991	0,993	0,992	0,992	0,00100	0,10081
50	1,202	1,201	1,201	1,201	0,00058	0,04806



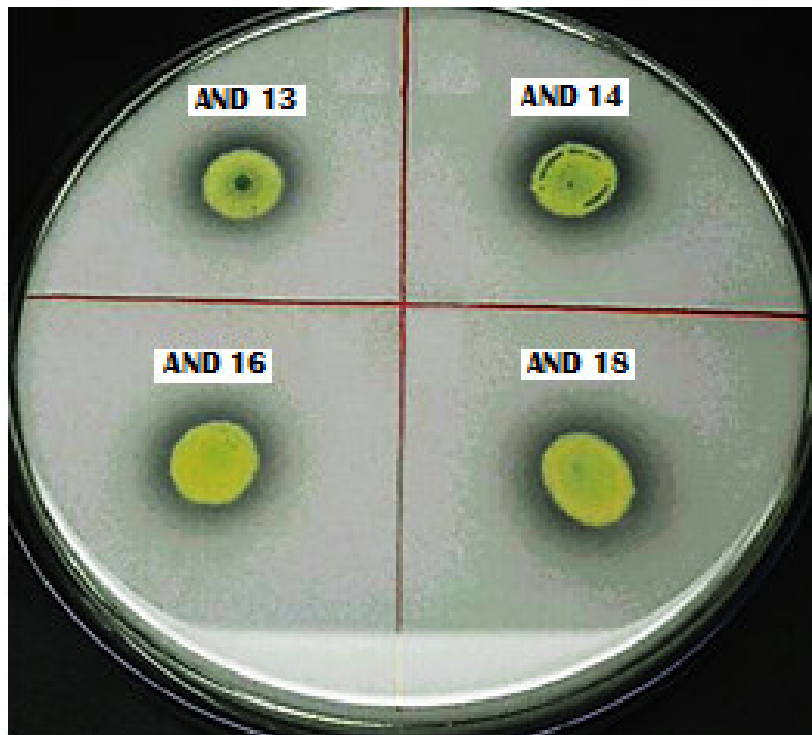
## ANEXO 2: FIGURAS



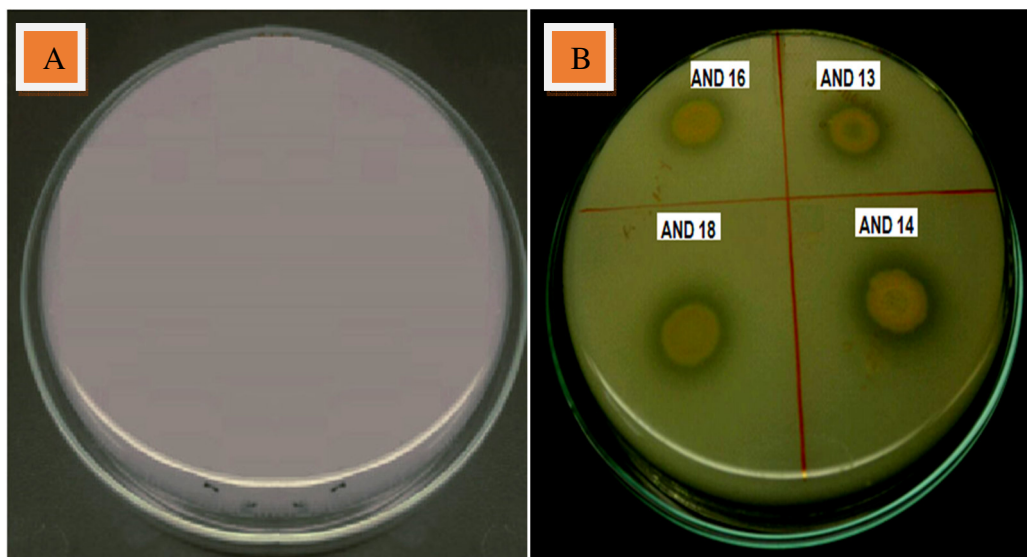
**Figura 2.** Muestra de rizósfera y raíces obtenidos de cultivos de *Solanum tuberosum*.



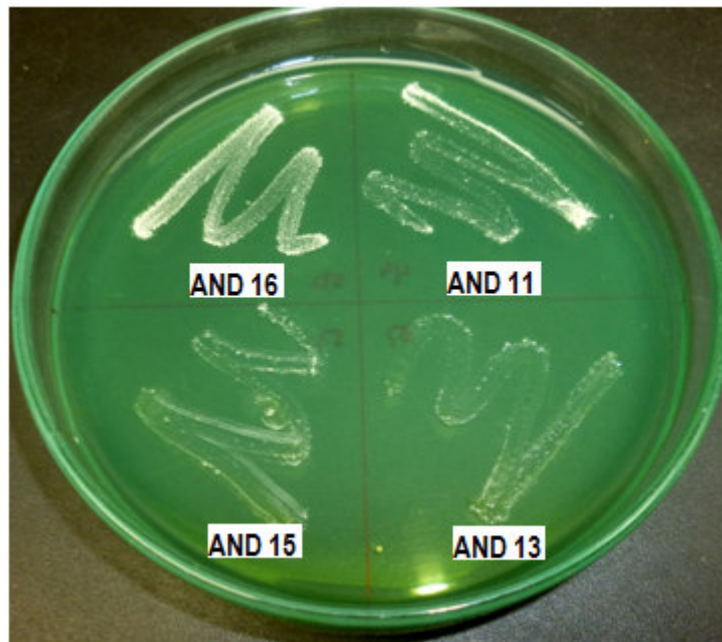
**Figura 3:** Aislamiento de actinomicetos en Agar Almidón Caseína.



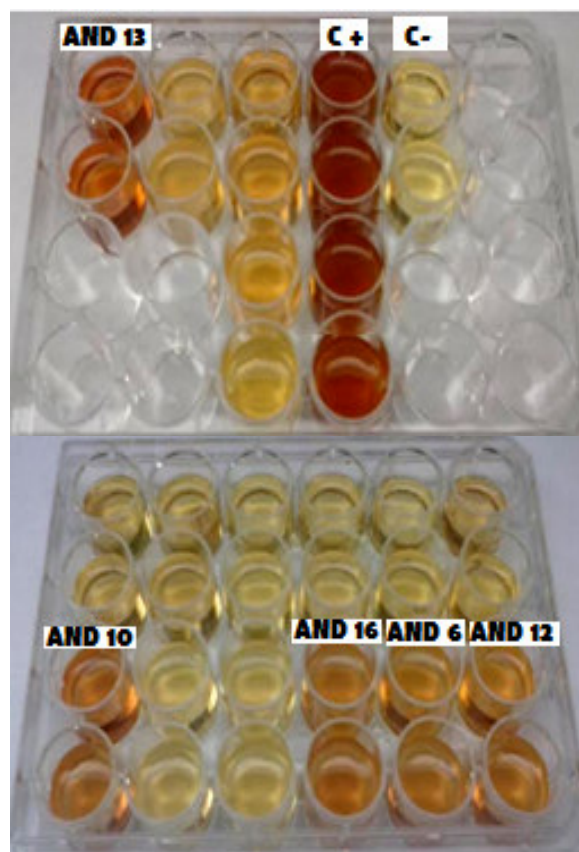
**Figura 4:** Prueba de solubilización de fosfatos en Agar Picovskaya.  
(Presencia de halos alrededor de las colonias)



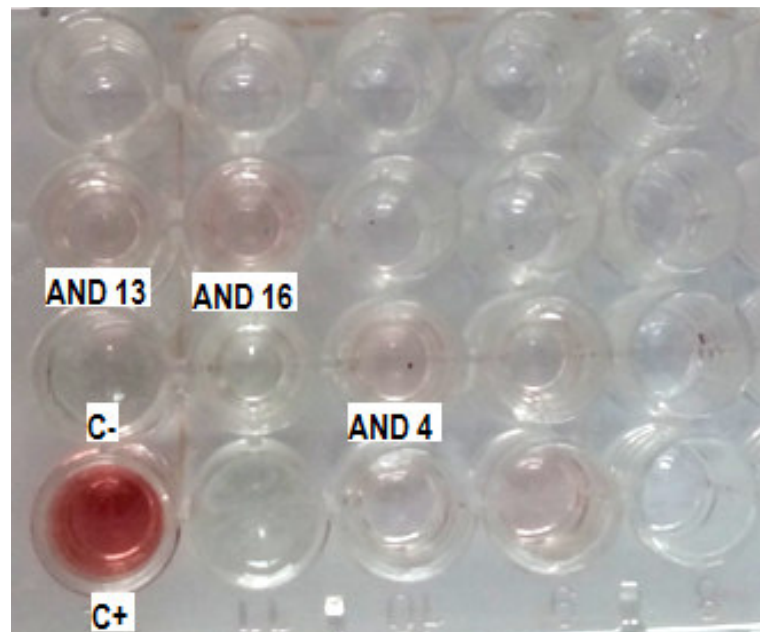
**Figura 5:** Prueba de solubilización de fosfatos en Agar SRSM.  
A) Control negativo. B) Presencia de halos de solubilización y viraje del color del medio.



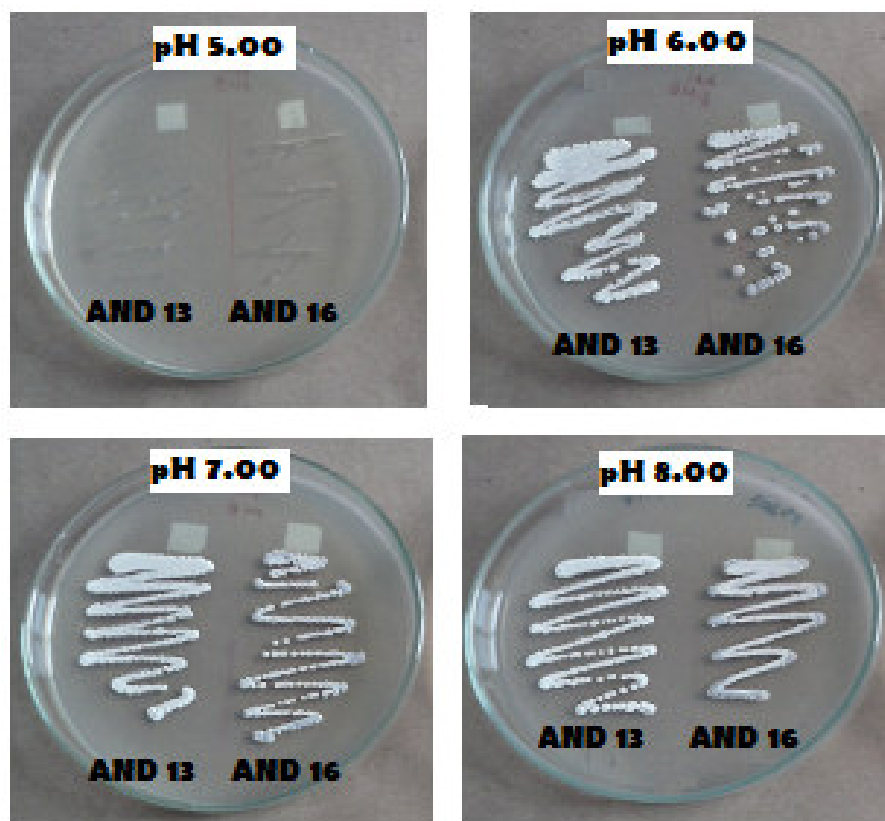
**Figura 6:** Prueba de fijación de nitrógeno, capacidad de crecimiento de las cepas de actinomicetos en Agar NFB.



**Figura 7:** Prueba cualitativa de producción de AIA de las cepas de actinomicetos aislados de la rizósfera de *S. tuberosum*.  
Imagen superior: Reacción colorimétrica del Control negativo (C-), Control positivo (C+)

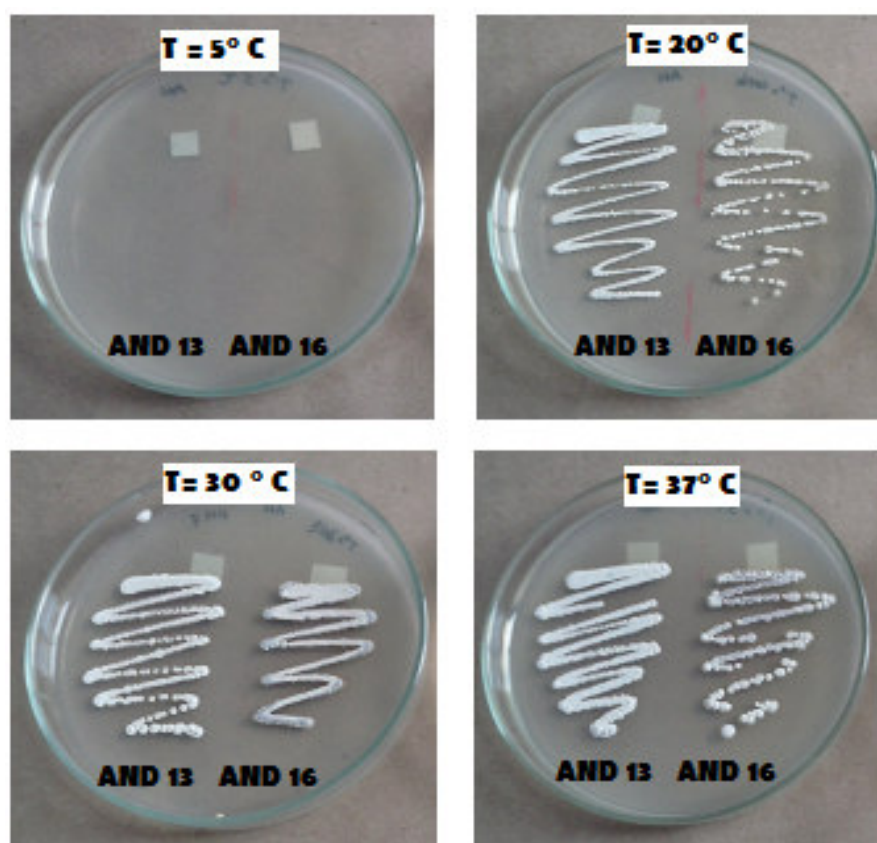


**Figura 8:** Prueba cualitativa de producción de sideróforos de las cepas de actinomicetos aislados de la rizósfera de *S. tuberosum*.  
C-: Control negativo, C+: Control positivo

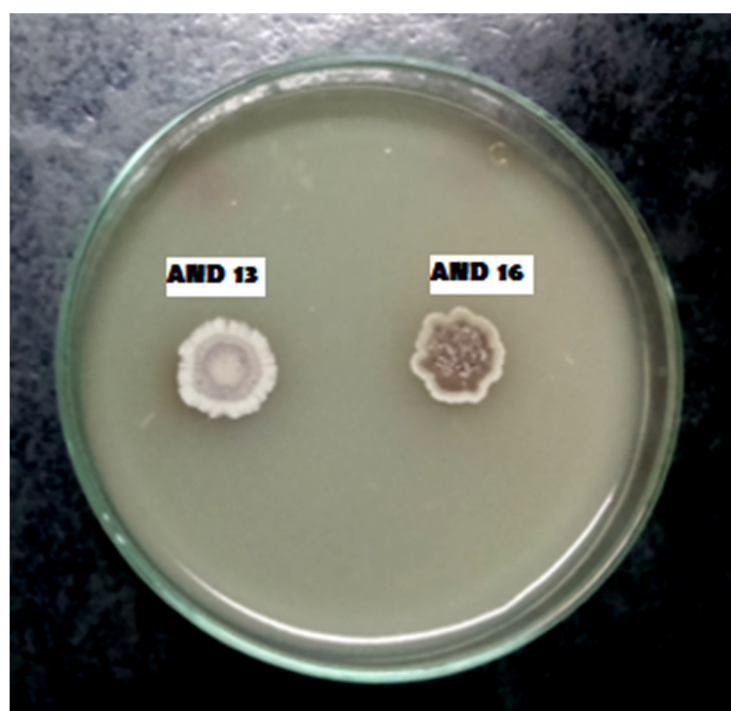


**Figura 9:** Caracterización fenotípica de las cepas AND 13 y AND 16 a diferente pH.

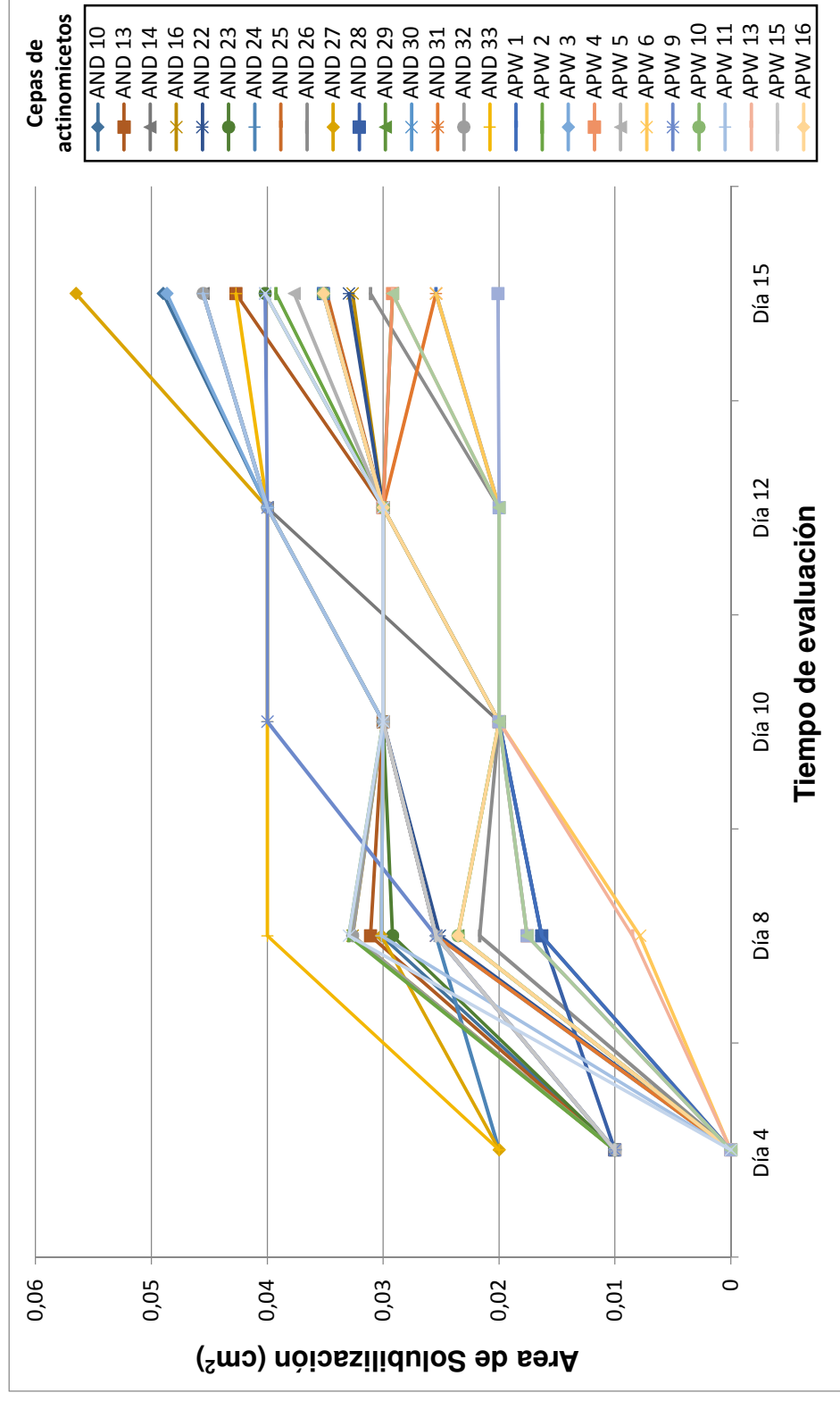




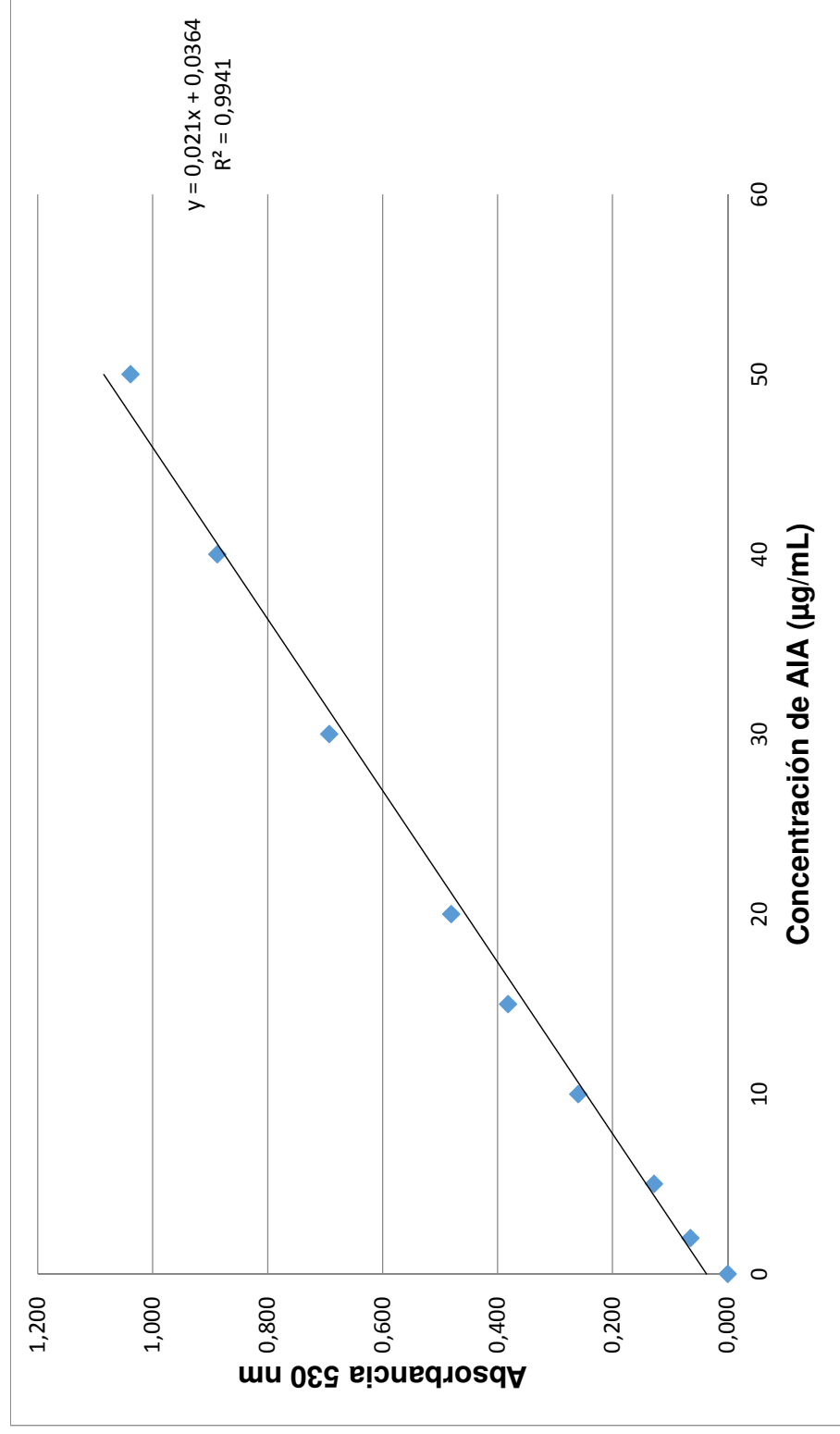
**Figura 10:** Caracterización fenotípica de las cepas AND 13 y AND 16 a diferente temperatura.



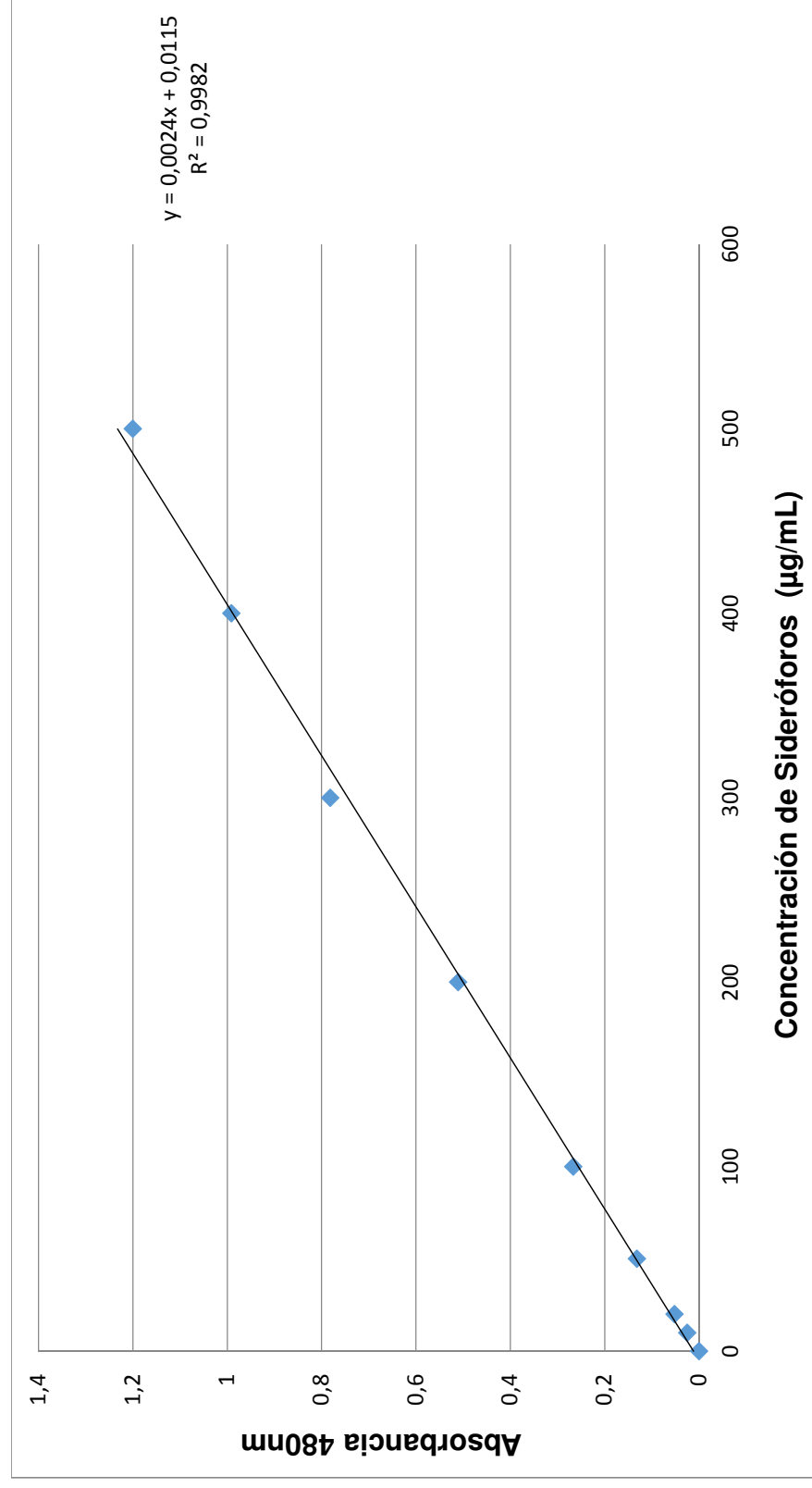
**Figura 11:** Actinomicetos seleccionados con potencial Promotor de crecimiento vegetal (PGPR).



**Figura 12.** Solubilización de fosfatos de las cepas de actinomicetos durante 15 días.



**Figura 13:** Curva patrón de la concentración del ácido indol acético comercial (SIGMA-ALDRICH).



**Figura 14:** Curva patrón de la concentración del sideróforo comercial DESFERAL (SIGMA-ALDRICH).



## ANEXO 3: MEDIOS DE CULTIVO

### 1. Agar Almidón Caseína (Wellington and Cross, 1983)

Medio sólido para el aislamiento de actinomicetos, este medio debe suplementarse con Ácido Nalidíxico (25 µl/mL) y Cicloheximide (100 µl/mL)

Componentes	g/L
Almidón soluble	10
Caseína hidrolizada	1
KNO <sub>3</sub>	2
NaCl	2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,05
CaCO <sub>3</sub>	0,02
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,01
Agar – Agar	18
pH 7.00 ± 0.2	

### 2. Medio Pikovskaya (Pikovskaya, 1948).

Medio de cultivo recomendado para la detección de organismos solubilizadores de fosfatos

Componentes	g/L
Extracto de levadura	0,5
Dextrosa	10
CaHPO <sub>4</sub>	5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5
KCl	0,2
MgSO <sub>4</sub>	0,1
MnSO <sub>4</sub>	0,001
FeSO <sub>4</sub>	0,001
Agar – Agar	18
pH 7.2 ± 0.2	

### 3. Medio SRSM-1 (Sundara, & Sinha, 1963).

Medio de cultivo para la producción de ácidos relacionados con la solubilización de fosfatos

Componentes	g/L
Extracto de levadura	0,5
Dextrosa	10
CaHPO <sub>4</sub>	5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5
KCl	0,2
MgSO <sub>4</sub>	0,3
FeSO <sub>4</sub>	0,004
Agar – Agar	18
Purpura de bromocresol	0,1
pH 7.2 ± 0.2	

### 4. Medio Selectivo para NFB (Dobereiner y Day, 1976).

Medio de cultivo para aislar bacterias fijadoras de nitrógeno

Componentes	g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,8
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2
CaSO <sub>4</sub>	0,1
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,001
Sacarosa	5
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,04
Agar – Agar	18
Azul de bromotimol: 0,2mL al 0,5% en KOH al 0,2N	
pH 7.6 ± 0.1	

## 5. Caldo Tripticasa Soya (Hamilton y Spink, 1950)

Medio de cultivo líquido utilizado como enriquecimiento para el crecimiento de los actinomicetos

Componentes	g/L
Tripticasa	17
Peptona	3
NaCl	5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5
Dextrosa	2,5
pH 7.00 ± 0.2	

## 6. Caldo Simón y Tessman (Simon & Tessman, 1963).

Medio de cultivo utilizado para la producción de sideróforos

Componentes	g/L
Succinato de sodio	10
NaCl	5,8
KCl	3,7
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,15
Tris	12,1
MgCl· 7H <sub>2</sub> O	0,1
NH <sub>4</sub> Cl	1,1
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	0,142
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,272
pH 6.8 ± 0.2	

### 7. Caldo B suplementado con triptona (Dobereiner y Day, 1976).

Medio de cultivo utilizado para inducir a la producción de auxinas como el ácido indol acético.

Componentes	g/L
Glucosa	5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,4
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,4
NaCl	0,2
Triptona	20
FeCl <sub>3</sub>	0,1
pH 7.00 ± 0.2	

### 8. Caldo Nitrato (Casellas, 1984).

Medio de cultivo utilizado para la demostración de producción de indol y reducción de nitratos

Componentes	g/L
Peptona de carne	8.6
NaCl	6.4
KNO <sub>3</sub>	1,5
pH 7.2 ± 0.1	

### 9. Caldo Úrea (Rustigian and Stuart, 1941).

Medio utilizado para demostrar la utilización de la urea por parte de los microorganismos

Componentes	g/L
Ext. Levadura	0.1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	9.1
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	9.5
Rojo de fenol	0.01
pH 6.8 ± 0.1	

#### 10. Agar Caseína (Martley, 1970).

Medio de cultivo utilizado para determinar la presencia de microorganismos proteolíticos

Componentes	g/L
Ext. Levadura	3.0
Peptona de carne	5.0
NaCl	5.0
Caseína	2.5
CaCl <sub>2</sub>	0.05
Agar – Agar	18
pH 7.2 ± 0.2	

#### 11. Medio Gelatina (Frazier, 1926).

Medio de cultivo utilizado para determinar la presencia de la enzima gelatinasa

Componentes	g/L
Peptona de carne	5.0
Extracto de carne	3.0
Gelatina	120
pH 7.0 ± 0.2	